TOPOGRAPHISCHE STUDIEN AN DEN ÄUßEREN ZELLWANDSCHICHTEN VON DEINOCOCCUS RADIODURANS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Franck Karrenberg
aus St. Maur des Fossés

Düsseldorf
1985

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0002

Topographische Studien an den äußeren Zellwandschichten von *Deinococcus radiodurans*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Franck Karrenberg
aus St.Maur des Fossés

Düsseldorf
1985

Diese Arbeit wurde angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Düsseldorf
am Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie,
Direktor: Prof.Dr.W.Vogell.

Referent: Prof.Dr.W.Baumeister

Korreferent: Prof.Dr.C.Hollenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 20.Dezember 1985

Druck: Fotodruck J.MAINZ GmbH,Aachen

A
mes Parents

"Ce sont les microbes qui
auront le dernier mot"
Louis Pasteur
(1822 - 1895)

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

AMP:	Adenosinmonophosphat
ATCC:	American Type Culture Collection, Rockeville, MD (USA)
BSA:	Rinderserumalbumin
CL:	Kohlenhydratkapsel
Cm:	cytoplasmatische Membran
CMC:	kritische Mizellenkonzentration
Cmp:	cytoplasmatisches Membranprotein
Cp:	Cytoplasma
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Deoxyribonucleinsäure
DTBP:	Dithiobis-(propionimidat-hydrochlorid)
DTSP:	Dithiobis-(succinimidylpropionat)
DTT:	Dithiothreitol
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
GB:	ganze Bakterien
HPI-Layer:	'hexagonally packed intermediate'-Layer
IM:	Intercalating Material
kD:	Kilo-Dalton
KDO:	2-Keto-3-deoxyheptonic Acid
LDAO:	Lauryl-dimethylamin-N-oxid
LDH:	Lactat Dehydrogenase
LiDS:	Lithiumdodecylsulfat
LPS:	Lipopolysaccharide
M:	molar; mol/L
mM:	millimolar; mmol/L
µM:	mikromolar; µmol/L
MEGA-10:	decanoyl-N-methylglucamid
MGapp:	apparentes Molekulargewicht
MTT:	Thiazol-Blue
NEM:	N-Ethylmaleinimid
NCS:	N-Chlorosuccinimid
OD_{660}:	Optische Dichte, Extinktion (bei λ = 660 nm)

Om:	outer membrane = äußere Membran
Omp:	outer membrane protein = äußeres Membranprotein
PAG:	Polyacrylamidgel
PAGE:	Polyacrylamidgelelektrophorese
PE:	Pink Envelope
PEp:	Pink Envelope-Protein
pf:	proteolytisches Fragment
PG:	Peptidoglycan = Murein
PM:	Phenazin-Methosulfat
PMSF:	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS:	periplasmic space = periplasmatischer Raum
Pt/C	Platin/Kohle
PWS:	Phosphorwolframsäure
RNA:	Ribonucleinsäure
S:	Surface Layer
SB_{12}:	Sulfobetaine, n = 12
SDH:	Succinat Dehydrogenase
SDS:	Sodiumdecylsulfat
STEM:	Scanning transmission electron microscope
T:	Temperatur
TA/W:	Tantal/Wolfram
TCA:	Trichloressigsäure
TEMED:	Tetramethyl-ethylendiamin
Tris:	Tris-(hydroxymethylaminomethan)
U:	Unit, Enzymeinheit
UWO:	Culture Collection of the University of Western Ontario, London, Ontario (Canada)
ZW:	Zellwände

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG

1.1 Das Bakterium *Deinococcus radiodurans* 1

1.2 Die generelle Morphologie der Zellwand von *Deinococcus radiodurans* 2

1.3 Die Morphologie der Pink Envelope 3

1.4 Die Feinstruktur des HPI-Layers 3

1.5 Problemstellung und methodisches Vorgehen ... 5

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienstämme 7

2.2 Kulturmedien 7

2.3 Zellanzucht 8

2.3.1 Batchkulturen 8

2.3.2 Kulturen für Wachstumskurve 8

2.4 Präparationen 9

2.4.1 HPI-Layer-Präparationen 9

2.4.1.1 Gewinnung aus ganzen Bakterien 9

2.4.1.1.1 Standartpräparation - 60°C - in SDS 9

2.4.1.1.2 Präparation mit Proteinase-Inhibitoren 10

2.4.1.1.3 Präparation mit LiDS bei 5°C 11

2.4.1.2 Gewinnung aus der Pink Envelope 11

2.4.2 Pink Envelope-Präparation 12

2.4.3 Murein-Sacculi-Präparation 13

2.5 Methoden zur Messung des Bakterienwachstums und zur Bestimmung makromolekularer Zellbestandteile 14

2.5.1 Optische Dichte der Zellsuspension 14

2.5.2 Zellzahlbestimmung in der Zellsuspension ... 14

2.5.3 Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) . 14

2.5.4 Saccharidbestimmung nach Dubois et al.(1956) 16

Seite

2.5.5 Lipopolysaccharidbestimmung nach Weissbach und Hurwitz (1959), Osborn (1963), Osborn et al. (1972) 16

2.5.6 Quantitative Fällungsmethode von Proteinen .. 18

2.5.6.1 TCA-Fällung 18

2.5.6.2 Methanol/Chloroform/Wasser-Fällung nach Wessel und Flügge (1984) 18

2.5.7 Heiße Phenol-Extraktion nach Westphal et al. (1952), Wawra et al. (1979) 19

2.5.8 Chloroform/Methanol-Extraktion nach Hasin et al. (1975), modifiziert 20

2.6 Enzymatische Nachweismethoden 21

2.6.1 Proteinase-Bestimmung 21

2.6.2 Succinat- und Lactat-Dehydrogenase-Bestimmung nach Osborn et al. (1972) 23

2.6.2.1 Bestimmung von MTT mit NADH nach Whitaker (1969) 24

2.7 Elektrophoretische Methoden 27

2.7.1 Analytische elektrophoretische Methoden 28

2.7.1.1 Nachbau und technische Verbesserungen einer PAGE-Apparatur zur analytischen Hochauflösung 28

2.7.1.1.1 PAGE-Kammer 28

2.7.1.1.2 Glasplatten 29

2.7.1.1.3 Gießvorrichtung 30

2.7.1.2 Diskontinuierliche Puffersysteme in der SDS-PAGE 31

2.7.1.2.1 Puffersystem nach Laemmli (1970), modifiziert 32

2.7.1.2.2 Puffersystem nach Neville (1974), modifiziert 33

2.7.1.2.3 Herstellung der Gele mit einer linearen Konzentration an Acrylamid 35

2.7.1.2.4 Probenaufarbeitung unter denaturierenden Bedingungen 37

2.7.1.3 Gießtechnik für die zweidimensionale Analyse von Gelstreifen 39

2.7.2 Präparative Gelelektrophorese 41

2.7.2.1 Elektroelution von Polypeptiden nach Hunkapiller et al. (1983) 41

2.7.3 Nachweismethoden von Proteinen in Gelen 43

Seite

2.7.3.1 Coomassiefärbung 43
2.7.3.2 Silberfärbung nach Wray et al. (1981) 44
2.7.4 Laufparameter der Elektrophorese 46
2.7.4.1 PAGE 46
2.7.4.2 Elektroelution 47
2.7.5 Computer-unterstützte Auswertungsmethoden für die PAGE 48
2.7.5.1 Bestimmung von apparenten Molekulargewichten . 48
2.7.5.1.1 Theoretischer Hintergrund 48
2.7.5.1.2 Auswahl der Markerproteine 49
2.7.5.1.3 Aufstellung der Eichkurve 49
2.7.5.1.4 Digitale Aufarbeitung der Gelmuster 50
2.7.5.2 Quantitative Messungen an Proteinbanden in PAG nach Stanley und Pitt (1983) 50
2.7.5.3 Digitale Aufarbeitung der zweidimensionalen Peptide Mapping-Aufnahme 51
2.8 Peptide Mapping 55
2.8.1 Beschreibung der Methode nach Lischwe und Ochs (1982) 56
2.8.2 Eindimensionales Peptide Mapping 57
2.8.3 Zweidimensionales Peptide Mapping 57
2.8.4 Auswertung und Grenze der Methode 58
2.9. Biochemische Methode der topographischen Analyse 59
2.9.1 Schonende Detergenssolubilisierung 59
2.9.1.1 Ziele der Methode 59
2.9.1.2 Solubilisierungskriterien 61
2.9.1.3 Nicht-ionische Detergenzien 63
2.9.1.3.1 MEGA-10: decanoyl-N-methylglucamid 63
2.9.1.3.2 Triton X-114: Alkylphenylpolyoxyethylen 64
2.9.1.4 Zwitterionische Detergenzien 66
2.9.1.4.1 SB-12: Sulfobetain (SBn) = 3-(alkyldimethylammonio)-1-propanesulfonate 66
2.9.1.4.2 LDAO: N,N-dimetyllaurylamidoxid 67
2.9.2 Die reversible chemische Vernetzung 68

UNIV. LEIDEN BIBL.

Seite

2.9.2.1 Das Vernetzungsagent DTSP 68
2.9.2.2 Methodik der Vernetzung 70
2.9.2.2.1 Vorbereitung der zweidimensionalen PAGE 73
2.9.2.3 Prinzip der zweidimensionalen Kartierung von Vernetzungsprodukten 73
2.9.2.4 Interpretation und Grenze der Methode 75
2.10 Elektronenmikroskopische Methode 76
2.10.1 Suspensionspräparate 76
2.10.2 Schnittpräparate 77
2.10.2.1 Fixierungsmethode 77
2.10.2.1.1 Tannin + Glutaraldehyd/OsO_4 nach Mizuhira und Fataesaku (1972) 77
2.10.2.1.2 Glutaraldehyd/OsO_4 + Rutheniumrot nach Luft (1971), Kessel (1978) 78
2.10.2.2 Einbettung 79
2.10.2.3 Schneidetechnik 80
2.10.2.4 Nachkontrastierung 80
2.10.2.4.1 Wässeriges Bleihydroxyd ($Pb(OH)_2$) 80
2.10.2.4.2 Doppelkontrastierung: Uranylacetat nach Gibbon und Grimstone (1960) + Bleicitrat nach Venable und Coggeshall (1965) 81
2.10.3 Gefrierätzung 82
2.10.4 Bedampfungstechniken 82
2.10.4.1 Lufttrocknung 83
2.10.4.2 Gefriertrocknung 83
2.10.5 Methode für den Enzymnachweis und die Enzymlokalisation 84
2.10.5.1 5'-Nucleotidase (Nucleosid-5'-phosphomonoesterase) nach Wachstein und Meisel (1957), Nisonson et al. (1969), modifiziert 84
2.10.5.2 (3'→5')-Exonuclease (Orthophosphoric diester phosphohydrolase) 85
2.10.6 Mikroskopie 86
2.11 Sonstige Methoden 86
2.11.1 Infrarotspektroskopie 86
2.11.1.1 Begründungen und Ziel der Untersuchungen 86
2.11.1.2 Grundlage der Meßmethode 87

Seite

2.11.1.2.1 ATR-Technik 87
2.11.1.2.2 Meßbereich 87
2.11.1.2.3 Auftragung der Probe 87
2.11.1.2.4 Quantitative Ermittlung des Lipidgehaltes in einem Lipid-Protein-Gemisch nach Karrenberg (1981) 88
2.11.2 Aminosäuren-Analyse 88
2.11.3 Hydrophobizitätsberechnung von Proteinen anhand von Aminosäuren-Analyse nach Barrentes (1981) 88
2.11.4 Dichte-Bestimmung mit Percoll 90
2.11.5 Entfernung von Detergens aus Proteinlösungen. 91
2.11.5.1 Isoamylalkohol-Extraktionsmethode nach Mather und Tamplin (1979), Salcedo et al. (1983) ... 91
2.11.5.2 Bio-Beads SM-2-Extraktionsmethode nach Horigome und Sugano (1983) 91
2.12 Proteinase-Behandlung des nicht dissoziierten HPI-Layers 92
2.13 Herkunft der Chemikalien 93

3. ERGEBNISSE

3.1 Katalog der Pink Envelope-Proteine (R_1, Sark) 94
3.1.1 Morphologie der Zellwände von ganzen Bakterien 94
3.1.2 Proteolyse: *in vivo* oder *in vitro*? 95
3.1.2.1 Proteolyse des HPI-Layer-Proteins in Abhängigkeit vom Wachstum 95
3.1.2.2 Messung der Wirksamkeit von Proteinase-Inhibitoren an ganzen Zellen (GB) 97
3.1.2.3 Effektivität von zwei Inhibitoren (Cu^{++}/PMSF), getestet an der Präparation des HPI-Layers 98
3.1.3 Die Pink Envelope (PE): Vergleich zwischen R_1 und Sark 100
3.1.3.1 Trennung von Pink Envelope und cytoplasmatischer Membran 100
3.1.3.1.1 Morphologischer Nachweis 100
3.1.3.1.2 Enyzmatischer Nachweis 102
3.1.3.1.3 Elektrophoretische Untersuchung nach Solubilisierung mit Triton X-100 103
3.1.3.2 Aktivität der Om-gebundenen Proteinase in verschiedenen Pink Envelope-Präparationen .. 103

Seite

2.9.2.1 Das Vernetzungsagent DTSP 68
2.9.2.2 Methodik der Vernetzung 70
2.9.2.2.1 Vorbereitung der zweidimensionalen PAGE 73
2.9.2.3 Prinzip der zweidimensionalen Kartierung von Vernetzungsprodukten 73
2.9.2.4 Interpretation und Grenze der Methode 75
2.10 Elektronenmikroskopische Methode 76
2.10.1 Suspensionspräparate 76
2.10.2 Schnittpräparate 77
2.10.2.1 Fixierungsmethode 77
2.10.2.1.1 Tannin + Glutaraldehyd/OsO_4 nach Mizuhira und Fataesaku (1972) 77
2.10.2.1.2 Glutaraldehyd/OsO_4 + Rutheniumrot nach Luft (1971), Kessel (1978) 78
2.10.2.2 Einbettung 79
2.10.2.3 Schneidetechnik 80
2.10.2.4 Nachkontrastierung 80
2.10.2.4.1 Wässeriges Bleihydroxyd ($Pb(OH)_2$) 80
2.10.2.4.2 Doppelkontrastierung: Uranylacetat nach Gibbon und Grimstone (1960) + Bleicitrat nach Venable und Coggeshall (1965) 81
2.10.3 Gefrierätzung 82
2.10.4 Bedampfungstechniken 82
2.10.4.1 Lufttrocknung 83
2.10.4.2 Gefriertrocknung 83
2.10.5 Methode für den Enzymnachweis und die Enzymlokalisation 84
2.10.5.1 5'-Nucleotidase (Nucleosid-5'-phosphomonoesterase) nach Wachstein und Meisel (1957), Nisonson et al. (1969), modifiziert 84
2.10.5.2 (3'→5')-Exonuclease (Orthophosphoric diester phosphohydrolase) 85
2.10.6 Mikroskopie 86
2.11 Sonstige Methoden 86
2.11.1 Infrarotspektroskopie 86
2.11.1.1 Begründungen und Ziel der Untersuchungen 86
2.11.1.2 Grundlage der Meßmethode 87

Seite

2.11.1.2.1 ATR-Technik 87
2.11.1.2.2 Meßbereich 87
2.11.1.2.3 Auftragung der Probe 87
2.11.1.2.4 Quantitative Ermittlung des Lipidgehaltes in einem Lipid-Protein-Gemisch nach Karrenberg (1981) 88
2.11.2 Aminosäuren-Analyse 88
2.11.3 Hydrophobizitätsberechnung von Proteinen anhand von Aminosäuren-Analyse nach Barrentes (1981) 88
2.11.4 Dichte-Bestimmung mit Percoll 90
2.11.5 Entfernung von Detergens aus Proteinlösungen. 91
2.11.5.1 Isoamylalkohol-Extraktionsmethode nach Mather und Tamplin (1979), Salcedo et al. (1983) ... 91
2.11.5.2 Bio-Beads SM-2-Extraktionsmethode nach Horigome und Sugano (1983) 91
2.12 Proteinase-Behandlung des nicht dissoziierten HPI-Layers 92
2.13 Herkunft der Chemikalien 93

3. ERGEBNISSE

3.1 Katalog der Pink Envelope-Proteine (R_1, Sark) 94
3.1.1 Morphologie der Zellwände von ganzen Bakterien 94
3.1.2 Proteolyse: *in vivo* oder *in vitro*? 95
3.1.2.1 Proteolyse des HPI-Layer-Proteins in Abhängigkeit vom Wachstum 95
3.1.2.2 Messung der Wirksamkeit von Proteinase-Inhibitoren an ganzen Zellen (GB) 97
3.1.2.3 Effektivität von zwei Inhibitoren (Cu^{++}/PMSF), getestet an der Präparation des HPI-Layers 98
3.1.3 Die Pink Envelope (PE): Vergleich zwischen R_1 und Sark 100
3.1.3.1 Trennung von Pink Envelope und cytoplasmatischer Membran 100
3.1.3.1.1 Morphologischer Nachweis 100
3.1.3.1.2 Enyzmatischer Nachweis 102
3.1.3.1.3 Elektrophoretische Untersuchung nach Solubilisierung mit Triton X-100 103
3.1.3.2 Aktivität der Om-gebundenen Proteinase in verschiedenen Pink Envelope-Präparationen .. 103

Seite

3.1.3.3 Bestimmung der Lipopolysaccharide (LPS) in verschiedenen Pink Envelope-Präparationen . 105

3.1.3.4 Bestimmung der Zucker in verschiedenen Pink Envelope-Präparationen 106

3.1.3.5. Infrarot-Spektroskopie 108

3.1.3.5.1 Vergleich der Zellwand- und Pink Envelope-IR-Spektren vor und nach der Tritonbehandlung (R_1, Sark) 108

3.1.3.5.2 Vergleich der IR-Spektren aus dem Triton-solubilisat und der Lysozymphase von Zellwänden (Sark) 110

3.1.3.5.3 IR-Spektren aus der Phenol- und Chloroform/Methanol-Extraktion an der Pink Envelope (Sark) 111

3.1.3.5.4 Vergleich der Spektren aus gereinigter Pink Envelope (R_1, Sark, Sark (CL^-), Sark (HPI^-) 113

3.1.3.6 Kataloge der Pink Envelope-Proteine (PEp von R_1/Sark) 114

3.1.3.6.1 SDS-PAGE der PEp-Proteine 114

3.1.3.6.1.1 Kataloge der PEp-Proteine 114

3.1.3.6.1.2 Lysozym-Reinigung der Pink Envelope 118

3.1.3.6.2 Peptide Mapping-Untersuchungen an den PEp-Proteinen 122

3.1.3.6.2.1 Peptide Mapping von einzelnen extrahierten PEp-Proteinen 122

3.1.3.6.3 Homologie-Studie an den HPI-Layer-Proteinen (PEp B) an R_1 und Sark: Peptide Mapping und Proteinase-Verdauung an dem isolierten HPI-Layer 125

3.1.3.6.3.1 Peptide Mapping an den HPI-Layer-Proteinen 125

3.1.3.6.3.2 Proteinase-Verdauung an dem isolierten HPI-Layer (R_1 und Sark) 126

3.2 Topographie (Sark) 129

3.2.1 Temperaturabhängige Dissoziationsreihe der Pink Envelope 129

3.2.2 Mureinassoziierte PEp-Proteine 130

3.2.2.1 Temperaturabhängige Extraktion der Zellwände mit SDS 130

3.2.2.2 Morphologische Auswirkungen der Extraktion der Zellwand mit SDS 132

Seite

3.2.3 Vernetzung der PEp-Proteine 133

3.2.3.1 Laterale Beziehungen der PEp-Proteine 134

3.2.3.1.1 Analyse von Vernetzungsprodukten in der ersten SDS-PAGE-Dimension nach SDS-Solubilisierung (eindimensionale Vernetzungskarte) . 134

3.2.3.1.2 Zweidimensionale Analyse von Vernetzungsprodukten der ersten PAGE-Dimension nach SDS-Solubilisierung (zweidimensionale Vernetzungskarte) 136

3.2.3.2 Transversale Beziehung der PEp-Proteine zum HPI-Layer-Protein 142

3.2.3.2.1 Elektronenmikroskopische Darstellung der vernetzten PEp-Proteine an dem HPI-Layer und Vergleich mit Bedampfungen an der Pink Envelope 144

3.2.4 Detergensextraktionen an ganzen Bakterien und Pink Envelope 147

3.2.4.1 Detergensextraktionen mit dem Detergens MEGA-10 148

3.2.4.1.1 An ganzen Bakterienzellen 148

3.2.4.1.2 An der Pink Envelope 149

3.2.4.2 Detergensextraktionen mit dem Detergens Triton X-114 151

3.2.4.2.1 An ganzen Bakterienzellen 151

3.2.4.2.2 An der Pink Envelope 152

3.2.4.2.3 Kondensationsexperimente mit Triton-114 153

3.2.4.3 Detergensextraktionen mit Detergens LDAO ... 156

3.2.4.3.1 An ganzen Bakterien 156

3.2.4.3.2 An der Pink Envelope 157

3.2.4.4 Detergensextraktionen mit dem Detergens SB-12 159

3.2.4.4.1 An ganzen Bakterienzellen 159

3.2.4.4.2 An der Pink Envelope 160

3.2.4.5 Allgemeine Zusammenfassung über die Detergensextraktionen an ganzen Bakterien und Pink Envelope 162

3.2.5 Aminosäurenanalysen 165

3.2.5.1 Aminosäurenanalysen der Haupt-PEp-Proteine (Sark) 165

3.2.5.2 Aminosäurenanalysen der HPI-Layer-Proteine (Sark, R_1) und einiger proteolytischer Spaltfragmente aus PEp B (R_1) 165

3.2.6 Hydrophobizität der PEp-Proteine 169

3.2.6.1 Hydrophobizität der Haupt-PEp-Proteine aus *Deinococcus radiodurans* und Vergleich mit bekannten Omp-Proteinen sowie Cmp-Proteinen aus anderen Organismen 169

3.2.6.2 Hydrophobizität der HPI-Layer-Proteine (Stamm Sark und R_1) und Hydrophobizitätsvergleich zwischen proteolytischen Spaltfragmenten des PEp B-Polypeptids (Stamm R_1)..... 170

3.2.7 Histochemischer und elektronenmikroskopischer Nachweis der 5'-Nucleotidase und (3'→5')-Exonuclease in der Zellwand von *Deinococcus radiodurans* Sark 177

3.2.7.1 Nachweis der 5'-Nucleotidase (PEp D) 177

3.2.7.2 Nachweis der (3'→5')-Exonuclease (PEp A) .. 178

4 DISKUSSION

4.1 Katalog der PEp-Proteine (Sark, R_1) 181

4.2 Die Topographie der PEp-Proteine aus *Deinococcus radiodurans* Stamm Sark 184

4.2.1 Die Aussagekraft der Vernetzungsergebnisse mit DTSP 187

4.2.2 Das Intercalating Material 190

4.2.3 Die äußere Membran (auch "Backing Layer" genannt) 192

4.2.4 Der S-Layer (auch "HPI-Layer" genannt) 195

4.2.5 Die Kohlenhydrat-Kapsel (auch "Capsular Layer" genannt) 198

4.3. Vergleich zwischen dem Proteinkatalog von *Deinococcus radiodurans* Sark und dem von *Escherichia coli* 198

4.4 Vergleich der molekularen Architektur der äußeren Zellwände aus *Deinococcus radiodurans* und *Escherichia coli* 201

4.4.1 Das Intercalating Material von *Deinococcus radiodurans* Sark und die Mittelschicht von *Escherichia coli* 202

4.4.2 Die äußere Membran von *Deinococcus radiodurans* und von *Escherichia coli* 204

4.5 Mögliche Funktionen der Pink Envelope und Überlegungen zur Bedeutung der PEp A- und PEp D-Proteine für das Bakterium 205

Seite

4.5.1 Überlegung zur Funktion der Pink Envelope 205
4.5.2 Überlegung zur Bedeutung von PEp A- und PEp D-Proteinen für das Bakterium 207

5. ZUSAMMENFASSUNG 109

6. LITERATURVERZEICHNIS 213

7. ANHANG: Tafel/Bildbeschreibung 233

1. Einleitung

1.1 Das Bakterium *Deinococcus radiodurans*

Deinococcus radiodurans ist ein braun-rosa pigmentierter Tetracoccus. Der Zellwandaufbau des Gram-positiven (u.a. Gram-variabel) Bakteriums zeigt erhebliche Abweichungen von den Strukturprinzipien Gram-positiver Bakterien (Thornley et al., 1965; Work und Griffiths, 1968; Glauert und Thornley, 1969; Lancy und Murray, 1978; Sleytr, 1978; Emde et al., 1980; Thompson et al., 1982). Aufgrund des für die Gattung *Micrococcus* untypischen sehr komplizierten Zellwandaufbaus und zahlreicher physiologischer und histochemischer Charakteristika wurden "*Micrococcus radiodurans*" und einige offenbar verwandte Species (wie *M. radiophilus*, *M. radioproteolyticus*, *M. erythromyxa* z.B.) als nicht zu der Familie der Micrococcaceae zugehörig erkannt (Brooks et al., 1980). Diese Species haben sich vielmehr früh in der prokaryontischen Evolution von dem Hauptstamm abgezweigt (Brooks et al., 1980; Stackebrandt und Woese, 1979; Fox et al., 1980). Dies veranlaßte Brooks et al. (1981), "*Micrococcus radiodurans*" neu zu benennen und systematisch neu einzuordnen. Die neue Familie nennt sich *Deinococcaceae*, die neue Gattung trägt den Namen *Deinococcus* (aus dem Altgriechisch übersetzt: der sonderbare Kokkus).

Deinococcus radiodurans Stamm R_1 wurde zum erstenmal in Fleischdosen, die zur Entkeimung mit 2 - 3 M. rad ionisierenden γ-Strahlen behandelt worden waren, isoliert (Anderson et al., 1956). Der Stamm Sark wurde ohne Bestrahlung als Luftkontamination durch Murray und Robinov (1958) isoliert.

Neben der bemerkenswerten Strahlenresistenz ist das Bakterium resistent gegen UV-Licht (Duggan et al., 1959). Experimente zeigten, daß *Deinococcus radiodurans* DNA-Doppelstrangbrüche mit großer Effizienz zu reparieren vermag (Dean et al., 1966;

Dertinger und Jung, 1969; Kitayama und Matasuyama, 1971; Burrell et al., 1971; Kushner, 1973). Bestrahlungsexperimente mit γ-Strahlen an *Deinococcus radiodurans* deuten auf eine Beteiligung der Zellwand an Reparatur oder Schutzmechanismen im Organismus hin. Ein interessantes Indiz dafür ist die Tatsache, daß nach γ-Bestrahlung eine aktive Exonuclease, begleitet von Polysacchariden aus der Zellwand des Bakteriums, an das Außenmilieu abgegeben wird (Gentner und Mitchel, 1975; Mitchel, 1975; 1976; 1978; 1980; 1981).

1.2 Die generelle Morphologie der Zellwand von *Deinococcus radiodurans*

Die bisherigen elektronenmikroskopischen Studien an der Zellwand von *Deinococcus radiodurans*, Stamm R_1, wurden zumeist an mechanisch desintegrierten und partiell verdauten Zellwandschichten durchgeführt (Thornley et al., 1965; Work und Griffiths, 1968). Später wurden solche Studien auch auf den Stamm Sark des Bakteriums ausgedehnt (Lancy und Murray, 1978; Thompson et al., 1982). Die an isolierten Schichten erzielten Daten zur Morphologie der Zellwand erlaubten nicht die Aufstellung eines eindeutigen Gesamtbauplans.

Emde et al. (1980) erarbeiteten mit Hilfe von Gefrierätzungsexperimenten, Ultradünnschnittpräparaten, verknüpft mit begrenzten Verdauungen und Solubilisierungsversuchen, eine präzise Studie der Zellwandmorphologie. Der Zellwandaufbau von *Deinococcus radiodurans* (siehe Tafel 1) zeigt, daß die Wand aus sieben voneinander abgegrenzten Schichten besteht. Die innerste Zellwandschicht bildet die cytoplasmatische Membran. Darüber liegt das perforierte Murein mit Löchern von einem Durchmesser von ungefähr 10 bis 11 nm (Thompson und Murray, 1982). Das Murein ist von der cytoplasmatischen Membran durch den periplasmatischen Raum getrennt. Über dem Murein liegt die sogenannte Pink Envelope. Sie besteht aus

vier Schichten. Nächst dem Murein liegt das Intercalating-Material. Darüber liegt die äußere Membran (auch Backing-Layer genannt). Die äußere Membran ist eng assoziiert mit dem darüber liegenden Surface-Layer/S-Layer; auch Hexagonally Packed Intermediate-Layer genannt (HPI-Layer), der die ganze Oberfläche des Bakteriums bedeckt. Der HPI-Layer wiederum ist von einer Kohlenhydrat-Kapsel bedeckt.

1.3 Die Morphologie der Pink Envelope

Die Pink Envelope wird durch Abbau des Mureins mit Lysozym aus der Zellwand isoliert (siehe 2.4.2). Der Ultradünnschnitt durch die Pink Envelope (siehe Tafel 16, Abb. B) zeigt, daß sie aus vier Schichten besteht. Auf der konkaven Innenseite des Zellwandfragments befinden sich Reste des Intercalating-Materials, darüber liegt die äußere Membran mit ihrer Doppellinienstruktur. Auf dieser liegt der HPI-Layer, als punktierte dunkle Linie zu erkennen. Reste der Kohlenhydrat-Kapsel befinden sich auf dem HPI-Layer auf der konvexen Seite des Zellwandfragments.

Das Suspensionspräparat (siehe Tafel 16, Abb. A) zeigt eine Projektion der Pink Envelope. Das hexagonale Muster des HPI-Layers (Gitterkonstanten von 18 nm) (Baumeister und Kübler, 1978; Kübler und Baumeister, 1978; Kübler et al., 1980; Baumeister et al., 1981) ist auf der Oberfläche klar zu erkennen. Durch übereinander liegende periodische HPI-Fladen entstehen Moiré-Muster (Kübler et al., 1980). Die Form der Pink Envelope-Fragmente wird durch den relativ starren Backing-Layer bestimmt (Emde, 1980).

1.4 Die Feinstruktur des HPI-Layers

Der HPI-Layer stellt im Moment das am genauesten untersuchte Protein der Zellwand aus *Deinococcus radiodurans* dar. Der

HPI-Layer ist ein wesentlicher Bestandteil der Zellwand, er gehört in die Kategorie der Regular Surface oder Surface-Layer. S-Layer-Proteine haben sich in der letzten Dekade als ubiquitäre Zellwandbestandteile bei Eubakterien und Archaebakterien erwiesen. Ihre Funktion ist noch weitgehend Gegenstand von Spekulationen (siehe div. Reviews). Aufgrund ihrer kristallinen Struktur sind S-Layer für elektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen besonders geeignet (Beveridge, 1981; Sleytr und Messner, 1983). Der HPI-Layer ist eng mit der äußeren Membran der Zellwand assoziiert, vermutlich über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen seiner Innenseite und einem oder mehreren Proteinen der äußeren Membran. Der HPI-Layer ist ein zweidimensionaler Proteinkristall mit einer Schichtdicke von ca. 6 nm. Mit Hilfe von Metallbedampfungen konnte deutlich zwischen einer "glatten" äußeren Seite und einer "rauhen" inneren, der äußeren Membran zugewandten Seite unterschieden werden (Baumeister et al., 1981).

Das HPI-Layer Protein besteht aus einem Polypeptid (MG app = 108 kD bei Sark; 104 kD bei R_1) (Karrenberg, 1981; Baumeister et al., 1982; Karrenberg et al., 1982; Rachel, 1982). Stammspezifische proteolytische Spaltungen solcher Proteine scheinen ein verbreitetes Phänomen darzustellen, dies erschwert die biochemische Charakterisierung solcher S-Layer (Koval und Murray, 1984). Bei *Deinococcus radiodurans* scheint die Proteolyse des S-Layers *in vivo* stattzufinden. Aber STEM-Massenbestimmungen des Proteins *in situ* zeigten, daß keine Polypeptidfragmente des Proteins verloren gehen (Rachel et al., 1983). In den vergangenen sieben Jahren wurde die Strukturaufklärung des HPI-Layers mit Hilfe der verschiedensten elektronenmikroskopischen Methoden und neuartigen digitalen Bildverarbeitungsmethoden vorangetrieben: mit Negativkontrastierung (Kübler und Baumeister, 1978; Saxton und Baumeister, 1982), mit Metallbedampfungstechniken (Baumeister et al., 1981; Wildhaber et al., 1985; Wildhaber, 1983) und mit unkontrastierten gefriergetrockneten Präparaten (Engel et al., 1982).

Die Tafel 2, Abb. A zeigt ein Balsaholzmodell einer dreidimensionalen Rekonstruktion des HPI-Layers (Auflösung 1.5 nm). Die Untereinheiten sind in P 6-Symmetrie um eine Pore (Durchmesser: an der Außenseite 6 nm, an der Innenseite des Layers 3.5 nm angeordnet und bilden eine massive "Core"-Region. Von jeder Untereinheit der "Core" gehen "Spokes" aus, die die Verbindung zu benachbarten "Cores" bilden (Baumeister et al., 1985).

1.5 Problemstellung und methodisches Vorgehen

Wie aus dem einleitend Gesagten hervorgeht, ist die Schichtung der Zellwand weitgehend bekannt. Es fehlen dagegen Informationen über weitere Proteinbestandteile der Pink Envelope, lediglich zwei Zellwandenzyme(eine Exonuclease (Gentner und Mitchel, 1975) und eine 5'-Nucleotidase (Mitchel, 1973)) sind bislang nachgewiesen worden. Für ein Verständnis der Funktion der strukturell teilweise sehr gut charakterisierten Zellwand-Komponenten (HPI-Layer) sind genaue Kenntnisse der molekularen Architektur der gesamten Zellwand unerläßlich. Ein erster Schritt in dieser Richtung ist die Ermittlung und Katalogisierung der Protein-Komponenten der Pink Envelope. Der zweite Schritt nach der Aufstellung des Proteinkatalogs ist die topographische Zuordnung der Hauptproteine dieses Katalogs zu den verschiedenen morphologischen Schichten der Pink Envelope.

Ziel der Arbeit war es letztendlich, durch kombinierte Anwendung verschiedener biochemischer und elektronenmikroskopischer Methoden sowie unter Verwendung bekannter Strukturinformationen zu einer möglichst detaillierten Vorstellung von der molekularen Architektur der "Pink Envelope" von *Deinococcus radiodurans* zu gelangen.

Für Gram-negative Bakterien existieren Modelle der molekularen Architektur nur für die Enterobakterien (z.B.

Escherichia coli und *Salmonella typhimurium*, die bis jetzt am meisten untersuchten Mikroorganismen) (Lugtenberg und Van Alphen, 1983; Nikaido und Vaara, 1985). Dies legt einen Vergleich mit der molekularen Architektur von *Deinococcus radiodurans* nahe.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

Zu der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Spezies der *Deinococcaceae* untersucht:

- *Deinococcus radiodurans* Anderson R_1 (*D. radiodurans* R_1), Anderson et al., 1956) aus "American Type Culture Collection, Rockville, MD." (ATCC. 13939).
- *Deinococcus radiodurans* Sark (*D. radiodurans* Sark), (Murray und Robinov, 1958) aus "Culture Collection of the University of Western Ontario, London, Canada" (UWO. 298).
- *Deinococcus radiodurans* Sark Mutante: Capsular layer minus (*D. radiodurans* Sark Cl^-).
- *Deinococcus radiodurans* Sark Mutante: HPI-Layer minus (*D. radiodurans* Sark HPI^-).

Die beiden zuletzt erwähnten Varianten aus *Deinococcus radiodurans* Sark, als spontane Labormutanten, wurden auf Agarnährboden entdeckt und isoliert.

2.2 Kulturmedien

Die Bakterien wurden auf Nähragar und auf flüssige Nährlösung nach Work und Griffiths (1968) bei 30°C gezüchtet. Sie konnten bis zur Weiterkultivierung auf Nähragar für einige Wochen bei 5°C gelagert werden.

Nähragar: mit Nutrient Agar (Difco) (2.3 % w/v) und D(+) Glucose Monohydrat (1 % w/v).

Flüssige Nährlösung: mit Bacto-Trypton (Difco) (0.5 % w/v), Hefeextrakt (Difco) (0.3 % w/v), D(+)Glucose Monohydrat (0.1 % w/v) und D.L. Methionin (0.1 % w/v).

2.3. Zellanzucht

2.3.1 Batchkulturen

Die lyophilisierten Collection-Bakterien wurden zuerst in dem Nährmedium gezüchtet, anschließend auf Schrägagarnährböden überimpft und als Impfstamm bereitgehalten (siehe 2.2.1).

Die Bakterien aus diesen Stammkulturen wurden in dem Nährmedium (1L/2L Erlenmeyerkolben) in einem Inkubator der Firma Braun, Melsungen, bei einer Temperatur von 30°C und einer Schüttelfrequenz von 180/min aerob gezüchtet. Die Kulturen wurden für präparative Zwecke an der späten log-Phase (d.h. nach ca. 22 Wachstumsstunden (R_1) und 20 Wachstumsstunden (Sark)) geerntet.

Die Zellernte geschah durch Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge J 21c, Beckman. Die Kulturen wurden in 400 ml-Zentrifugationsbecher verteilt, und die Bakterien wurden bei 1600 x g (R_1) und 2800 x g (Sark) 20 min lang bei 5°C pelletiert. Die Pellets wurden vereinigt und einmal in Präparationspuffer Tris/HCl, 25 mM, pH 7.8 gewaschen. Wenn die Zellen nicht sofort verarbeitet werden mußten, wurden sie in den gleichen Puffer aufgenommen und bei -18°C eingefroren.

2.3.2 Kulturen für Wachstumsversuche

Wachstumsversuche wurden je nach den Erfordernissen der Experimente in 2 L Erlenmeyer-Kolben oder in einem 5 L Freihals-Rundkolben durchgeführt. Die Bebrütungstemperatur von 30°C wurde mit Hilfe einer im Inneren des Kolbens gelegten Spirale aus Siliconschlauch, angeschlossen an ein temperiertes Wasserbad, konstant gehalten. Für die Belüftung der Kulturen sorgte eine "Luftpumpen-Vorrichtung" mit Regulierventil. Diese Verbindung zum Kolben wurde über zwei sterile Filter hergestellt. Die Belüftungsverbindung ragte

bis zum Boden des Gefäßes. An die letzte Halsöffnung war eine Entlüftungsvorrichtung mit sterilem Filter und einer Probenentnahmestelle angeschlossen. Die Kulturflüssigkeit wurde über den ganzen Versuch mit Hilfe eines Magnetrührers in Bewegung gehalten. Das Gefäß wurde für jedes Experiment mit 2.5 L Nährmedium gefüllt. Das Inokulum mit einer Vorkultur wurde so gewählt, daß die OD_{660} der Hauptkultur ca. 0.01 - 0.02 betrug.

2.4 Präparationen

Für alle Präparationen wurden die Bakterien aus 6 L Nährmedium (jeweils nach ca. 22 Wachstumsstunden für R_1, die OD_{660} betrug ca. 0.58, die Menge an Zellproteinen war 72 mg/L Kultur; und nach ca. 20 Wachstumsstunden für Sark, die OD_{660} betrug ca. 0.64, die Menge an Zellproteinen war ca. 82 mg/L Kultur) gewonnen.

2.4.1 HPI-Layer-Präparationen

Der HPI-Layer wurde nach zwei verschiedenen Methoden präpariert.

2.4.1.1 Gewinnung aus ganzen Bakterien

2.4.1.1.1 Standardpräparation - 60°C - in SDS

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (1600 x g (R_1), 2800 x g (Sark) 20 min bei 5°C pelletiert und in dem Präparationspuffer (Tris/HCl, 25 mM, pH 7.8) einmal gewaschen. Das Pellet wurde in dem auf 60°C vorgewärmten Präparationspuffer mit SDS (2 % w/v) (Detergens/Proteinverhältnis 20 : 1 (w/v)) gelöst. Die Detergensinkubation dauerte 90 min bei 60°C im Schüttelwasserbad. Anschließend wurde das Inkubat

bei 25°C 15 min lang zum Abkühlen gerührt. Die Bakterienrümpfe wurden durch Zentrifugation (3600 x g - 20 min - 20°C) vom Überstand getrennt. Der HPI-Layer im Überstand wurde dann pelletiert (10 000 x g - 60 min - 20°C). Der so gewonnene ungereinigte HPI-Layer wurde mit Hilfe der isopyknischen Gradientzentrifugation mit einem Percoll-Gradienten von Zellresten befreit. Das Pellet wurde zuerst in den Präparationspuffer mit SDS (1 % w/v) aufgenommen und mit dem gleichen Volumen Percoll versetzt. Der sich selbst aufbauende Gradient wurde zentrifugiert (48 000 x g - 60 min - 20°C). Die Trennung zeigte eine obere weiße Bande mit dem HPI-Layer (Dichte 1.045 g/ml) und darunter eine diffuse breite Bande mit den Bakterienrümpfen. Die HPI-Layer-Bande wurde abgesaugt. Der Layer wurde anschließend vorsichtig auf einem Saccharose-"Kissen" (70 % w/v) vom Percollrest (1 ml HPI-Suspension + 5 ml Saccharose-Lösung (70 % w/v) befreit (48 000 x g - 60 min - 20°C). Der HPI-Layer sammelte sich an der Grenzfläche. Er wurde abgesaugt und einmal in dem Präparationspuffer mit 1 % SDS (w/v) gewaschen. Der Layer wurde schließlich in wenig Präparationspuffer mit SDS (1 % w/v) aufgenommen. Der HPI-Layer wurde bei -18°C aufbewahrt (siehe auch Tafel 3).

2.4.1.1.2 Präparation mit Proteinase-Inhibitoren

Für die Präparationen wurden ausschließlich zwei Inhibitoren, $CuCl_2$ und PMSF, benutzt.

Die Präparationen mit Cu^{++}-Ionen in Form von $CuCl_2$ verlief, wie in 2.4.1.1.1 beschrieben, mit folgenden Änderungen. Die Bakterien wurden nach der Ernte mit dem Präparationspuffer mit 25 mM $CuCl_2$ einmal gewaschen. Nach dem ersten Waschgang wurden die Zellen in der gleichen Lösung unter ständigem Rühren inkubiert (3 h - 5°C). Anschließend wurden die Bakterien pelletiert und von überschüssigen Kupferionen durch einen Waschgang in Präparationspuffer (1600 x g (R_1),

2800 x g (Sark), 20 min - 5°C) befreit. Der weitere präparative Verlauf fand unter den in 2.4.1.1.1 beschriebenen Standard-Bedingungen ohne Inhibitorzusatz statt.

Die Präparation mit PMSF erforderte den Zusatz des Inhibitors in einer Konzentration von 5 mM für den ersten Waschgang der Zellen. Die Konzentration wurde in dem Detergensinkubationsschritt auf 2 mM herabgesetzt. Die folgenden Schritte wurden in Abwesenheit des Inhibitors durchgeführt. Die PMSF-Stammlösung wurde generell in einer Konzentration von 1 M in Essigsäureäthylester angesetzt (siehe auch Tafel 3).

2.4.1.1.3 Präparation mit LiDs bei 5°C

Alle Präparationsschritte mit SDS (siehe 2.4.1.1.1) wurden mit LiDs (2 % w/v) ersetzt und bei 5°C durchgeführt. Die Detergensinkubation der ganzen Zellen wurde auf 4 Std. ausgedehnt.

2.4.1.2 Gewinnung aus der Pink Envelope

Die Pink Envelope (siehe 2.4.2) wurde in dem Präparationspuffer mit SDS (2 % w/v) und PMSF (2 mM) (Detergens/Protein Verhältnis 4 : 1 (w/w)) 30 min lang bei 60°C inkubiert. Dieses Verfahren wurde im Mikromaßstab in Eppendorfgefäßen durchgeführt. Der HPI-Layer wurde vom Solubilisat durch Zentrifugation (10 000 x g - 20 min - 25°C) abgetrennt und pelletiert. Der Layer wurde in dem gleichen Puffer mit SDS einmal gewaschen (10 000 x g - 20 min - 25°C). Zum Ende wurde der Layer in wenig Präparationspuffer mit 1 % SDS (w/v) aufgenommen (siehe auch Tafel 3).

2.4.2 Pink Envelope Präparation

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (1600 x g (R_1), 2800 x g (Sark) - 20 min - 5°C) pelletiert und einmal in dem Präparationspuffer (Tris/HCl - 25 mM - pH 7.8 - PMSF (5 mM)) gewaschen. Das Zellpellet wurde in demselben Puffer aufgenommen und in einer Zellmühle (10 min - 5°C) mit Glasperlen gefällt (1/3 Probe + 2/3 Glasperlen), homogenisiert. Das Homogenisat mit den zerschlagenen Zellen wurde auf einer Glasfilternutsche (Porenweite 40 - 100 µm) von den Glasperlen getrennt. Das Homogenisat wurde anschließend, um die ganzen Zellen zuerst abzutrennen, zentrifugiert (1200 x g - 20 min - 5°C). Der Überstand wurde weiterverarbeitet und die durch cytoplasmatische Membranen noch verunreinigten Zellwände zentrifugiert (1800 x g - 20 min - 5°C) und so von Zellinhaltsbestandteilen abgesondert.

Das gewonnene Zellwand-Pellet wurde zur Solubilisierung der Reste von cytoplasmatischen Membranen mit Detergens behandelt. Die Triton-Behandlung fand in dem Präparationspuffer plus PMSF (2 mM) (1 - 2 mg Protein/ml (4 % w/v) Triton X 100) 30 min lang bei 30°C im Schüttelwasserbad statt. Die von cytoplasmatischen Membranresten befreiten Zellwände wurden vom Solubilisat durch Zentrifugation (18 000 x g - 20 min - 5°C) abgetrennt und schließlich einmal in dem Präparationspuffer plus PMSF (2 mM) gewaschen. Die Zellwände wurden in dem zuletzt genannten Puffer plus PMSF (2 mM) einer DNA/RNAase-Inkubation (je 120 µg Enzym/ml) (30 min - 25°C) ausgesetzt. Nach diesem Schritt wurden die Zellwände pelletiert und einmal im Präparationspuffer plus PMSF (2 mM) (18 000 x g - 20 min - 5°C) gewaschen. Das Pellet wurde mit Lysozym (Proteinasefrei) in Begleitung von Bacitracin (je 100 µg/ml Tris/HCl-Puffer - 25 mM - pH 6.8 - PMSF (2 mM)) inkubiert. Lysozym (Endo-N-Acetylneuraminidase) diente dem hydrolytischen Abbau der ß (1 → 4) Glycosidbindung des Peptidoglycans.

Bacitracin (Polypeptid-Antibiotikum) diente der Verhinderung von fremdem mikrobiellem Wachstum durch Hemmung der Peptidoglycansynthese.

Die Inkubation verlief über Nacht (ca. 16 Std.) im Schüttelwasserbad bei 30°C. Die gewonnene Pink Envelope, frei von Mureinresten, wurde pelletiert (48 000 x g - 30 min - 10°C). Das Pellet wurde einmal im Präparationspuffer plus PMSF (2 mM) und KCl-Salz (0.2 M) gewaschen (48 000 x g - 30 min - 10°C). Diese Behandlung mit KCl-Salz (0.2 M) diente einer quantitativen Entfernung von gebundenem Lysozym aus der Präparation. Anschließend wurde das Pellet einmal im Präparationspuffer plus PMSF (2 mM) gewaschen, um den Überschuß an KCl-Salz zu entfernen (48 000 x g - 30 min - 10°C).

Die fertige Pink Envelope Präparation (rosa-orange gefärbt) wurde, sofern nicht sofort verwendet, bei -18°C aufbewahrt. Das Material hielt sich ohne erkennbare Veränderung über Monate hinweg (siehe auch Tafel 3).

2.4.3 Murein-Sacculi Präparation

Das Ausgangsmaterial waren Zellwände, befreit von cytoplasmatischer Membrankontamination. Die Zellwandsuspension wurde in kleine Aliquots in eine auf 100°C vorerhitzte 3 %ige (w/v) SDS-Lösung (angefertigt im Präparationspuffer plus PMSF (2 mM)) einpipettiert. Das Detergens/Protein-Verhältnis betrug 7 : 1 (w/w). Die Inkubation dauerte 30 min bei 100°C. Die gebildeten Murein-Sacculi wurden durch Zentrifugation (10 000 x g - 20 min - 25°C) gewonnen und so vom Solubilisat getrennt. Anschließend wurde das Pellet in dem gleichen Puffer mit Detergens einmal gewaschen. Die Sacculi wurden, wenn nicht unmittelbar verwendet, bei -18°C eingefroren (siehe auch Tafel 3).

Diese Präparation fand ausschließlich im Mikromaßstab statt. Die Zentrifugationsschritte wurden mit der Eppendorftischzentrifuge durchgeführt.

2.5 Methoden zur Messung des Bakterienwachstums und zur Bestimmung makromolekularer Zellbestandteile

2.5.1 Optische Dichte der Zellsuspension

Zur routinemäßigen Kontrolle des Wachstums wurde die optische Dichte bei 660 nm (OD_{660}) im Photometer (Shimadzu-Spectronic 210 UV) gegen Aqua-bidest gemessen. Die Nährlösung hatte gegenüber Aqua-bidest eine zu vernachlässigende Grundextinktion. Proben mit einer $OD_{660} > 0.3$ wurden mit Aqua-bidest zur Messung verdünnt. Kein störender Absorptionseffekt durch die Carotinoidpigmente der Zellen konnte festgestellt werden.

2.5.2 Zellzahlbestimmung in der Zellsuspension

Für diesen Zweck wurde die Thomakammer verwendet. Die Zahl der Bakterien pro Großquadrat wurde bei jeder Beobachtung auf ca. 50 bis 80 nach einer Verdünnung der Zellsuspension beschränkt. Bewegung und Wachstum der Bakterien wurden durch Zugaben von Formaldehyd (1.75 % (v/v) Endkonzentration) vor dem Einfüllen in die Kammer unterdrückt (Drews, 1968).

2.5.3 Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951)

Proteinkonzentrationen wurden mittels der Methode nach Lowry ermittelt. Nichtlösliche Proteinbestandteile in ganzen Zellen, Zellwänden, Pink Envelope etc. wurden zunächst in Lösung gebracht. Die proteinhaltige Probe wurde mit NaOH (0.1 N Endkonzentration) versetzt und 90 min lang bei 60°C inkubiert (Drews, 1968). Anschließend wurde die Probe auf Zimmertemperatur abgekühlt.

Reagenzien:

Lösung A:	Na_2CO_3	8 g
	NaOH (1 N)	10 ml
	Aqua bidest ad	100 ml
Lösung B:	$CuSO_4$	0.5 g
	KNa Tartrat	1.0 g
	NaOH (1 N)	10 ml
	Aqua bidest ad	100 ml
Lösung C:	Folin-Cio-calteus-Reagenz	22.73 ml
	Aqua bidest ad	50 ml
Lösung D:	das alkalische Cu-Tartrat-Reagenz	
	Lösung A:	50 ml
	Lösung B:	1 ml

Die Lösung D wurde unmittelbar vor der Bestimmung angesetzt.

Zu 0.2 ml (verdünnter) Probe, die 5 bis 100 µg Protein enthielt, wurden 1.0 ml Lösung D zugemischt, nach 10 min mit 0.1 ml Lösung C vermischt, bei 25°C 30 min lang inkubiert und die Extinktion der Proben gegen einen Reagenzienleerwert bei 578 nm gemessen.

Die Auswertung erfolgte anhand einer parallel zur Messung durchgeführten Eichkurve mit 0 bis 100 µg BSA/Ansatz.

Die Proben, die mit Detergenz versetzt waren, wurden vorher vom Detergenz befreit (siehe 2.11.5).

2.5.4 Saccharidbestimmung nach Dubois et al. (1956)

Reagenzien:

Lösung A: konzentrierte Schwefelsäure p.A.
(spezifisches Gewicht: 1.84 g/cm³)

Lösung B: Phenol 5 g
Aqua bidest ad 100 ml

Zu 1 ml unverdünnte Proben, die 5 bis 100 µg Saccharide enthielten, wurden 1 ml Lösung B zugemischt und sofort mit 5 ml Lösung A versetzt.

Nach 30 min Inkubationszeit bei Zimmertemperatur wurden die Extinktionswerte gegen einen Reagenzienleerwert bei 485 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand einer Eichkurve mit 0 bis 100 µg eines Gemisches aus reduzierenden Zuckern, zusammengesetzt aus Fucose, 2-deoxy-D-Glucose, Mannose, Galactose und Saccharose, jeweils im äquivalenten Verhältnis zueinander.

Die Proben (wie z.B. HPI-Layer), die präparativ durch Saccharide kontaminiert waren, wurden von dieser Kontamination durch eine TCA-Fällung in der Kälte befreit (siehe 2.5.6.1).

2.5.5 Lipopolysaccharidbestimmung nach Weissbach und Hurwitz (1959), Osborn (1963), Osborn et al. (1972)

Die Lipopolysaccharide, gebunden an Membranfraktionen, wurden anhand der KDO-Bestimmung nach der Thiobarbitursäure-Methode von Weissbach und Hurwitz (1959), verändert durch Osborn (1963) und Osborn et al. (1972), quantitativ ermittelt.

Reagenzien:

Lösung A:	Schwefelsäure (0.018 N Endkonzentration)	
Lösung B:	Schwefelsäure (0.125 N Endkonzentration)	
Lösung C:	Perjodsäure	
	($H_5 JO_6$)	0.114 g
	Lösung B	ad 100 ml
Lösung D	Natriumarsenit	
	($NaAsO_2$)	2 g
	Lösung E	ad 100 ml
Lösung E:	Salzsäure	
	(HCl)	(0.5 N Endkonzentration)
Lösung F:	2 Thiobarbitursäure	
	($C_4H_4 N_2O_2S$)	0.3 g
	Aqua bidest	ad 100 ml

Die Proben mit ca. 0.2 bis 2 mg Protein wurden zuerst in der Eppendorf-Zentrifuge pelletiert (10 000 x g - 20 min - 25°C). Die Pellets wurden in 0.7 ml Lösung A aufgenommen und bei 100°C im Wasserbad 20 min lang hydrolysiert. Dieser Schritt diente zur Freisetzung von KDO aus LPS. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10 000 x g - 20 min - 25°C),und die Hydrolysate wurden zur Bestimmung aufgehoben.

Zu 0.2 ml Hydrolysat wurden 0.125 ml Lösung C hinzugemischt und für 20 min bei 25°C stehengelassen, dann 0.250 ml Lösung D hinzugemischt, 2 min bei der gleichen Temperatur stehengelassen, schließlich 1 ml Lösung F hinzupipettiert und gemischt. Die fertigen Mischungen wurden 20 min lang auf 100°C im Wasserbad erhitzt. Die Proben wurden anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt. Die Extinktionswerte des gebildeten Chromogens wurden gegen einen Reagenzienleerwert bei 548 nm gemessen.

Als interner Standard wurde eine gereinigte Lipopolysaccharid-Fraktion aus *Escherichia coli* von Prof. Dr. Rosenbusch (Biozentrum der Universität Basel, Basel, Schweiz) benutzt.

Bei eventuellem Auftritt von Trübungen wurden die gebildeten Chromogene in 1.5 ml Cyclohexanone extrahiert und in diesem Lösungsmittel gemessen. Der Anteil an freigesetzten Carotinoiden während der Hydrolyse störte die Bestimmung nicht.

2.5.6 Quantitative Fällungsmethoden von Proteinen

2.5.6.1 TCA-Fällung

Die verdünnten proteinhaltigen Proben wurden auf 0°C im Eisbad vorgekühlt und mit TCA (20 % w/v Endkonzentration) vermischt und bei 0°C 60 min lang inkubiert. Das gefällte Protein wurde in der Kühlzentrifuge (48 000 x g - 20 min - 0°C) pelletiert. Das Pellet wurde anschließend einmal in Äthyläther und zweimal in Aqua bidest gewaschen und in 2 % (w/v) SDS aufgenommen.

2.5.6.2 Methanol/Cloroform/Wasser-Fällung nach Wessel und Flügge (1984)

Diese Methode eignet sich gut für verdünnte proteinhaltige Lösungen in Gegenwart von Detergenzien und Lipiden.

Zu 0.1 ml proteinhaltiger Probe wurden 0.4 ml Methanol hinzupipettiert. Die Proben wurden sofort vermischt und auf der Eppendorfzentrifuge (9000 x g - 10 sec - 25°C) zentrifugiert. Dann wurde 0.1 ml Chloroform hinzugefügt, die Proben wurden vermischt und unter den gleichen zuletzt

genannten Bedingungen zentrifugiert. Die Phasentrennung geschah mit der Zugabe von 0.3 ml Aqua bidest und nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt (9000 x g - 1 min - 25°C). Die obere Phase wurde vorsichtig mit Hilfe einer Pipette entfernt. Zu der übrig gebliebenen Zwischenphase mit den gefällten Proteinen und der unteren Chloroformphase wurden 0.3 ml Methanol hinzugefügt und vermischt. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (9000 x g - 5 min - 25°C) und das Proteinpellet wurde meistens in 2 % (w/v) SDS oder als Suspension in Aqua bidest (für Aminosäuren-Analysen) aufgenommen.

2.5.7 Heiße Phenol-Extraktion nach Westphal et al. (1952); Wawra et al. (1979)

Bakterielle Proteine und Polysaccharide lassen sich voneinander trennen. Durch ihre unterschiedliche und selektive Löslichkeit in Phenol und Wasser eignet sich diese Methode zur Trennung dieser Substanzen. Proteine sind in Phenol, Polysaccharide dagegen besser in Wasser löslich.

Reagenzien:

Lösung A : Phenol 90 g
Aqua bidest ad 100 ml

Lösung B : Methanol/Aceton/Äther
im Verhältnis 1 : 1 : 1 (v/v)

Zu o.2 ml Pink Envelope (mit ca. 1 - 2 mg Protein in Aqua bidest aufgenommen), auf 65°C erwärmt, wurden 0.5 ml Lösung A auf 65°C erhitzt hinzugefügt und 30 min lang bei 65°C gerührt (in Reacti-vials-Pearce (USA)).

Anschließend wurden die Proben auf 5°C abgekühlt und bei 10 000 x g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Zwei Phasen bildeten sich, die obere wässerige Phase mit den Polysacchariden wurde abgezogen und die untere Phenol-Phase wurde erneut wie bis jetzt beschrieben extrahiert. Nach Beendigung der zweiten Extraktion wurden die wässerigen Phasen vereinigt und für Messungen verwendet. Die Proteine in der Phenolphase wurden mit 1.2 ml Methanol (purum) bei 0°C im Eisbad gekühlt und bei 10 000 x g 15 min lang bei 5°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal in 1 ml Lösung B gewaschen. Das schwerlösliche Pellet wurde als Suspension in Aqua bidest für Messungen aufgenommen.

2.5.8 Chloroform/Methanol-Extraktion nach Hasin et al. (1975) modifiziert

Reagenzien:

Lösung A: Chloroform/Methanol
im Verhältnis 2 : 1(v/v)

Zu einer entsprechenden Menge an gefriergetrockneter Pink Envelope-Fraktion (mit 0.5 bis 1 mg an Proteingehalt) wurden 200 µl Lösung A hinzugegeben. Die Probe wurde während der Extraktion 60 min lang bei 30°C im Wasserbad gerührt (im Reacti-vials-Pearce (USA)). Die Probe wurde mit Hilfe einer Tischzentrifuge bei 10 000 x g 15 min lang bei 25°C zentrifugiert. Die rosa gefärbte organische Phase mit den Lipiden wurde vom weißen Pellet getrennt. Das Pellet wurde erneut mit 0.5 ml Lösung A 60 min lang bei 30°C extrahiert und anschließend pelletiert. Die organische Phase wurde mit der ersten vereinigt und so für Messungen verwendet. Das Pellet wurde in Aqua bidest aufgenommen.

2.6 Enzymatische Nachweismethoden

2.6.1 Proteinase-Bestimmung

Durch eine proteolytische Verdauung werden farbige Peptidfragmente von diazotiertem Casein (eingesetzt als Proteinsubstrat) hydrolysiert und vom Substrat abgespalten. Diese Spaltfragmente sind in 6 % (w/v) Trichloressigsäure löslich. Die Extinktion (verursacht durch die Absorption der Diazoverbindung des Farbstoffes) ist proportional der Menge der Spaltprodukte und damit ein Maß für die Enzymaktivität.

Reagenzien:

Lösung A: Azocasein 3 g
Aqua bidest ad 100 ml

(aufbewahrt bei -18°C)

Lösung B: Trichloressigsäure 8 g
Aqua bidest ad 100 ml

(aufbewahrt und gekühlt bei 5°C)

Zu 0.2 ml Probe im Präparationspfuffer, pH 7.8, wurden 0.05 ml Lösung A hinzupipettiert. Der Ansatz wurde vermischt und 60 min lang bei 55°C (R_1) und 45°C (Sark) (Temperaturoptima ermittelt für die membrangebundene Proteinase (Emde, 1985)) im Wasserbad inkubiert. Die proteolytische Reaktion wurde mit 0.5 ml Lösung B gestoppt und der Ansatz wurde bei 10 000 x g 5 min lang bei 25°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und mit dem gleichen Volumen an Aqua bidest versetzt. Die Extinktion wurde bei λ = 366 nm gegen einen Reagenzienleerwert gemessen.

Der parallel zur Probe vorbereitete Reagenzienleerwert wurde wie folgt zubereitet:

Zu 0.2 ml Probe wurden 0.5 ml Lösung B gegeben, der Ansatz wurde vermischt und 0.05 ml Lösung A wurden schließlich hinzupipettiert. Der Ansatz wurde im Wasserbad wie oben beschrieben inkubiert und anschließend wurde die Fällung pelletiert und der Überstand als Reagenzienleerwert benutzt.

Proben mit Zellwänden, Pink Envelope und Detergenssolubilisaten wiesen nach der TCA-Fällung oft Trübungen auf. Der Überstand nach dem Zentrifugationsschritt wurde mit NaOH (1 N (1 : 1 (v/v)) versetzt. Diese Behandlung hob den Trübungseffekt auf. Das Absorptionsmaximum des Diazofarbstoffes verschob sich in diesem alkalischen Milieu auf λ = 436 nm. Der Umrechnungsfaktor betrug ca. 1 (OD_{366} : OD_{436} = 0.521 : 0.516). Der Reagenzienleerwert wurde in diesem Fall gleich behandelt.

Die Enzymeinheit wurde analog zu den Substratumsatzraten für Peptidsubstrat definiert.

Ein Unit (U) ist die Menge an Enzym, die ein µg Proteinsubstrat (Azocasein) pro ein ml und einer Minute unter optimalen Inkubationsbedingungen (Ionenstärke, pH, Temperatur) umsetzt.

Für den beschriebenen Ansatz ergab sich folgende Berechnungsformel:

$$1\ U = \Delta E \times 1000 \times 0.083$$

E = Extinktionswert der Probe minus Extinktionswert des Reagenzienleerwertes (Emde, 1985)

2.6.2 Succinat- und Lactat-Dehydrogenase-Bestimmung nach Osborn et al. (1972)

In der Hauptroute des Elektronentransports von Substraten zu molekularem Sauerstoff oder anderen terminalen Elektronenakzeptoren sind unterschiedliche Stoffklassen in die Übertragungskette involviert, Dehydrogenasen, Cytochrome, Flavoproteine, Eisenproteine und Chinonen (Rogers et al., 1980).

Eine der Pyridin-abhängigen Dehydrogenasen, die Nicotinamid-adenindinucleotid (NAD) als Coenzym benötigen, ist die Lactat-Dehydrogenase (LDH). Sie oxidiert Lacta zu Pyruvat und überträgt die 2[H] auf NAD:

$$\text{Lactat} + NAD^+ \overset{LDH}{\rightleftharpoons} \text{Pyruvat} + NADH + H^+.$$

Eine Flavin-abhängige Dehydrogenase, die Flavin-adenindinucleotid (FAD) als prosthetische Gruppe benötigt, ist die Succinat-Dehydrogenase (SDH), die ein Bestandteil des Tricarbonsäure-Zyklus ist. Sie oxidiert Succinat zu Fumarat und überträgt die 2[H] auf FAD:

$$\text{Succinat} + FAD \overset{SDH}{\rightleftharpoons} \text{Fumarat} + FADH_2.$$

Die Präsenz dieser beiden genannten Enzyme wurde ausschließlich an der cytoplasmatischen Membran wie bei *Salmonella typhimurium* (Osborn et al., 1972) und bei anderen Bakterien (Rogers et al., 1980; Chopra und Shales, 1980; Wilkinson und Eller, 1975; Ingledew und Poole, 1984) festgestellt. Die Lokalisation erlaubt,diese beiden Enzyme als Leitenzyme für die cytoplasmatische Membran zu benutzen. Die quantitative enzymatische Bestimmung dieser Dehydrogenasen wurde mit der Methode nach Osborn et al. (1972) durchgeführt.

Reagenzien:

Lösung A:	Na-Phosphatpuffer - 60 mM - eingestellt auf pH 7.5		
Lösung B:	Natriumcyanid (NaCN)		20 mM
	Thiazol-Blue (MTT) 3.(4',5'-dimethyl-thiazolyl-2.) -2,4-diphenyl-tetrazoliumbromid		60 µg
	Phenazin-Methosulfat (PMS)		20 µg
	Succinat		50 mM
	oder D-Lactat		5 mM
	Lösung A	ad	1 ml

Zu 0.5 ml Proben (Membranfraktionen mit 5 bis 100 µg Protein) wurden 0.5 ml Lösung B hinzugefügt und vermischt. Die Änderungen der Extinktion werden über eine Zeit von 10 min bei 22°C gegen einen Reagenzienleerwert mit Hilfe eines Philips-Single line-PM 8202-Recorders bei λ = 550 nm aufgezeichnet.

2.6.2.1 Bestimmung von MTT mit NADH nach Whitaker (1969)

Der Wasserstoff von reduzierten Nicotimamid-Coenzymen kann auch nichtenzymatisch auf Tetrazoliumsalze (MTT) übertragen werden, wenn man 5-Methylphenaziniummethylsulphat (Phenazinmethasulfat (PMS) zwischenschaltet. Die Reaktion verläuft analog zur langbekannten Wasserstoffübertragung von Redox-Enzymen auf PMS nach folgender Reaktion(siehe (1) und (2)).

Verschiedene handelsübliche Tetrazoliumsalze liefern bei der Reduktion nicht die gleiche Farbstärke der Formazane.

Für Absolutmessungen wurde eine Eichung nach Whitaker (1969) durchgeführt.

Statt Substrat setzt man in den Test eine passende bekannte (bei λ : 340 nm, optisch geprüfte) Menge NADH ein und ermittelt die resultierende Farbstärke des Formazans. Die Formazanmenge ist der eingesetzten NADH-Menge äquivalent, so daß sich der Extinktionskoeffizient des Formazan errechnen läßt. Die Reaktion läuft wie folgt ab:

(1) NADH + PMS ⟶ NAD^+ + reduzierter PMS

(2) reduzierter PMS + MTT ⟶ PMS + Formazan (farbig)

(1 µmol NADH reduziert 1 µmol MTT zu 1 µmol Formazanfarbstoff) (Bergmeyer und Bernt, 1977).

Reagenzien:

Lösung A:	Thiazolyl Blue (MTT)		20 mg
	Phenazin Methosulfat (PMS)		5 mg
	Triton X-100 (purum)		250 µl
	Aqua bidest.	ad	25 ml

NB: Triton X-100 dient zur Stabilisierung des Reagenz A

Lösung B:	Glycin/NaCl/HCl-Puffer:		
	Glycin		7.5 g
	NaCl		5.85 g
	mit konzentrierter Salzsäure (HCl) auf pH 3.0 titrieren		
	Aqua bidest		ad 100 ml

Lösung C:	Na-Phosphatpuffer - 100 mM - pH 7.4		
Lösung D:	NADH		4 mg
	Lösung C	ad	10 ml

NB: Das Reagenz (Lösung A) ist sehr lichtempfindlich und wurde in dunklen Gefäßen bei 5°C aufbewahrt. Lösung D wurde frisch unmittelbar vor der Bestimmung angesetzt.

Die bekannte Menge an NADH wurde wie folgt bestimmt:

zu 0.25 ml Lösung D wurden 0.75 ml Lösung C hinzugemischt und die Extinktion bei λ = 340 nm gegen einen Reagenzienleerwert gemessen:

$E^{\frac{mM}{mm}}_{340}$ = 6.2 (laut Angabe des Herstellers Sigma).

Nach der Beziehung

$$\frac{E^{\frac{340\ nm}{1\ cm}} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{E^{\frac{mM}{340}}} = \mu M\ NADH/ml$$

wurde für die Lösung D eine Endkonzentration von 0.48 µM NADH/ml errechnet.

Für die Kalibrierung des Formazanfarbstoffes wurde eine Verdünnungsreihe mit Lösung D wie folgt angefertigt:

0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12, 0.14, 0.16, 0.2 µM NADH/ml.

Zu 0.6 ml Lösung D (verdünnt mit Lösung C) wurden 0.2 ml Lösung A hinzupipettiert und eine Minute lang vermischt, anschließend 0.6 ml Lösung B hinzugefügt und sofort vermischt. Die erzeugten Extinktionswerte wurden gegen einen Reagenzienleerwert bei λ = 550 nm aufgezeichnet.

Eine lineare Standardkurve wurde mit der Auftragung der µM NADH/ml gegen die Extinktion (λ = 550 nm) hergestellt. Daraus wurde ein Extinktionskoeffizient (Σ) für den Formazanfarbstoff von Σ_{550} = 4.83 $\mu M^{-1} \cdot cm^{-1}$ kalkuliert.

2.7 Elektrophoretische Methoden

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) in Anwesenheit von SDS hat sich für die analytischen Studien von Bakterienzellwandproteinen zu einer standardisierten Technik etabliert. Unterschiedliche elektrophoretische Systeme mit unterschiedlicher Auflösung wurden eingesetzt (Lugtenberg et al., 1983).

Das Kriterium der Hochauflösung in der PAGE fordert die Erfüllung von drei Punkten:

(a) lange Trennstrecken durch lange Gele
(b) diskontinuierliche Puffersysteme
(c) lineare Gradienten an Polyacrylamid

Das Kriterium (a) erlaubt eine bessere Auftrennung der Polypeptide innerhalb eines Systems. Unterschiedliche Polypeptide, die die gleiche Mobilität durch eine schwache Auflösung in kurzen Gelen aufweisen, können durch eine längere Trennstrecke voneinander sichtbar getrennt werden. Die Darstellung von Neben- und die verbesserte Auftrennung von Haupt-Proteinkomponenten wird ermöglicht. Lange Gele sind für präparative Zwecke, wie die Isolierung von Polypeptidbanden für Antikörperbildung, Aminosäuren-Analyse, Ansequenzierung oder Peptide-Mapping-Studien von Vorteil (Young et al., 1983; Chua, 1980).

Die zweidimensionalen Techniken für Peptide-Mapping und die Analyse von Vernetzungsprodukten erfordern primär eine hervorragende Auflösung in der ersten PAGE-Dimension. Es bedeutet auch, daß das Gel für die zweite PAGE-Dimension breit sein muß, um die erste Dimension quer aufnehmen zu können.

Das Kriterium (b) erlaubt, mehrere SDS-Protein-Komplexe, deren Molekulargewichte über ein breites Intervall verteilt sind, zu konzentrieren und somit die Bandschärfe zu gewährleisten (Neville, 1974; Laemmli, 1970; Maurer, 1971).

Das Kriterium (c) erlaubt durch den Vorteil des Molekularsiebes die Trennung und Auflösung von Polypeptiden mit sehr unterschiedlichen Molekulargrößen (Margolis und Kenrick, 1968; Rodbard et al., 1971; Felgenhauer, 1974).

2.7.1 Analytische Elektronenphoretische Methoden

2.7.1.1 Nachbau und technische Verbesserungen einer PAGE-Apparatur zur analytischen Hochauflösung

2.7.1.1.1 PAGE-Kammer

Die PAGE-Kammer (aus Plexiglas) (Tafel 5, Abb. C) basiert, mit Modifikationen, auf dem Design der Havana-Trenneinheit der Firma DESAGA (Heidelberg).

Die Hauptänderungen beziehen sich auf den variablen Einsatz von unterschiedlichen Gelgrößen (hier bis zu einer Länge von 32 cm und einer Breite von 26 cm) und auf den oberen Trog (Tafel 4, Abb. C, D) (ca. 1.2 L Pufferkapazität). Er bekam eine stabile Aufhängungsvorrichtung (Abb. D (4)) mit drei Füßen (Abb. D (1)). Der Trog konnte samt eingespannter Glasplatten auf den Labortisch gestellt werden. Dies erleichterte den Pipettiervorgang der Proben in die Geltaschen.

Die Füße sorgten durch eine Arretierung (Abb. D (8)) unterhalb des Troges für eine sichere, waagerechte Positionierung der Glasplatten. Die Platten wurden mit Hilfe von drei Schrauben gegen zwei weiche versenkte Silicondichtungen (Abb. D (5)) unterhalb des Trogbodens angebracht, angepreßt. Diese einfache Vorrichtung löste in einer zuverlässigen Weise die allzu bekannten Abdichtungsprobleme.

Die Aufhängevorrichtung (Abb. D (1 und 4)) ist vollständig in ihre Bestandteile zerlegbar und erlaubt eine mühelose Umrüstung für diverse Plattendimensionen.

Der untere Trog (Abb. C) (ca. 10 - 12 L Pufferkapazität) wurde an die Plattendimension von einer Länge über 32 cm angepaßt. Die Thermostatisierung des Puffers, durch eine Kühlschlange angeschlossen an ein Kühlaggregat, und die Umwälzung des Laufpuffers durch eine Kreiselpumpe (Firma Eheim, Typ 1021 - maximale Förderleistung: 6 L/min - maximale Förderhöhe:ca. 1 m), entsprachen dem Prinzip der Havana-Kammer.

N.B.: Der Laufpuffer im unteren Trog (ca. 10 L) konnte für mehrere Läufe (30 bis 40) ohne Qualitätseinbuße der PAGE wochenlang in Anwesenheit von 0.001 % (w/v) Natriumazid benutzt werden.

2.7.1.1.2 Glasplatten

Routinemäßig wurden je nach Bedarf zwei Plattengrößen (Länge: 32 cm ad 16 cm, Breite: 26 cm) eingesetzt. Die Glasplatten bestanden aus flottiertem Glas (Dicke: 3 mm). Alle Kanten wurden manuell plan geschliffen. Die Glasplattenpaare wurden mit zwei seitlich angebrachten U-Schienen festmontiert (Tafel 5, Abb. A und Tafel 4, Abb. D (9)).

Ein Distanzstück aus Plexiglas wurde zwischen das Glas und die Schrauben der U-Schiene eingesetzt, um eine gleiche Verteilung des Druckes auf die gesamte Länge der Platten zu erreichen.

Die benutzten Distanzstücke (Standarddicke 1.5 mm) sollten die Glasplattenpaare seitlich in einer einfachen und zuverlässigen Weise abdichten (ein Problem, das bei den meisten in Laboren eingesetzten PAGE-Apparaturen nach Studier (1973) zu bewältigen ist). Das Schema (Tafel 5, Abb. A) gibt die Zusatzfunktion der Distanzstücke mit der integrierten weichen

Silicondichtung wieder. Die Dichtung ist etwas dicker als die Distanzstücke und ragt beidseitig über diese hinaus. Wenn die Platten zwischen die U-Schiene festgeschraubt werden, wird die Dichtung komprimiert bis zu dem Punkt, wo die Glasplatten auf den Distanzstücken aufliegen. Von diesem Zeitpunkt an sind die Platten seitlich vollständig für den Gießvorgang abgedichtet. Die Distanzstücke erwiesen sich als resistent gegen mechanische Deformationen und wurden mit Erfolg sogar bis zu einer Dicke von 1 mm eingesetzt.

Während des elektrophoretischen Laufes zeigten diese Distanzstücke einen zusätzlichen Vorteil. Er spiegelte sich in den perfekten vertikalen und horizontalen Läufen der Proben über die gesamte Breite von 26 cm. Die Proben in den äußeren Taschen konnten hervorragende und reproduzierbare Laufeigenschaft zeigen. Der analytische Vergleich zwischen Mobilitäten in unterschiedlichen Bahnen wurde über die gesamte Breite des Gels möglich. Der Grund für diesen positiven Effekt war eine seitliche elektrische Isolierung durch die Dichtung in dem PAGE-Lauf. Ein langes Gel in Tafel 5 (Abb. B) dokumentiert das Resultat. Man beachte die erzielte Auflösung eines Polypeptidgemisches auf einem Molekulargewichtsintervall von 120 kD bei 10 kD.

Die eingesetzten Kämme trugen 14 Taschen (Dimension einer Tasche: Höhe: 1,5 cm, Breite: 1 cm, Dicke, 1,5 mm).

2.7.1.1.3 Gießvorrichtung

Die Abdichtungsprobleme bei der PAGE beginnen mit der Herstellung des Gels. Um diese Problematik zu umgehen, wurde ein simpler, variabler und handlicher Polymerisationsständer entwickelt. Der hier vorgestellte Ständer (Tafel 4, Abb. A und Abb. B) besteht aus einem Grundsockel, der den freien Zugang zu der Unterseite (Abb. B (1)) erlaubt. In

der horizontalen Grundplatte (Abb. B (3)) sind zwei parallel versenkte Silicondichtungen (Abb. B (4)) angebracht. Das Dichtungsmaterial behielt eine weiche und dauerhafte Elastizität. Unterhalb jeder Dichtung befinden sich drei Einstechvorrichtungen (Abb. B (11)) für die Gießnadeln (Abb. B (12)). Sie sind so positioniert, daß alle denkbaren Plattenbreiten (hier bis 26 cm) eingesetzt werden können. In jeder Vorrichtung ist eine Silicondichtung eingeschlossen (Abb. B (12)). Der Vorteil ist, daß nach Beendigung des Gießvorganges und Entfernung der Nadeln das Stechloch sich lückenlos schließt. Diese Siliconmembranen lassen sich problemlos auswechseln. Oberhalb der horizontalen Platte sind drei Stützen (Abb. B (5) und (10)), die für eine waagerechte Position der eingesetzten Glasplatten sorgen. Die Glasplatten werden durch drei Schraubstöcke (Abb. B (8) und (9)) auf die unteren Dichtungen gepreßt. Die oberen Teile (Abb. B (8)) der Schraubstöcke sind schwenkbar und erlauben hiermit das Einsetzen der Glasplatten und der Kammer im Sammelgel. Alle Teile der Gießvorrichtung sind austauschbar, die Schraubstöcke und die mittlere Stütze (Abb. B (10)) werden der Plattenlänge angepaßt. Dieser Ständer macht einen gleichzeitigen Gießvorgang für zwei Gele möglich.

2.7.1.2 Diskontinuierliche Puffersysteme in der SDS-PAGE

Zwei alkalische diskontinuierliche Puffersysteme wurden für die SDS-PAGE ausgewählt:

(1) das Puffersystem von Laemmli (1970). Es wurde routinemäßig für die analytischen PAGE-Läufe eingesetzt.

(2) das Puffersystem von Neville (1974). Es wurde für PAGE-Läufe verwendet, wenn die aufgetrennten Polypeptide anschließend aus dem Gel zur Aminosäuren-Analyse elektroeluiert wurden. Dieses System benutzt kein Glycin als

Puffersubstanz, somit wurde eine Kontaminationsquelle dieser Aminosäure in der gesamten Aminosäuren-Analyse eines Polypeptids verhindert.

2.7.1.2.1 Puffersystem nach Laemmli (1970), modifiziert (Tris/HCl - Tris/Glycin)

Die Zahlen in Klammern stehen für die Endkonzentrationsangabe der Reagenzien. Die Zahl mit dem X-Zeichen steht für die Vielfachkonzentrationsangabe der Stammlösung.
Reagenzien:

Lösung Lae-A: 4 x Sammelgelpuffer
(0.125 M Tris - 1 mM EDTA - 0.1 % (w/v) SDS - pH 6.8)

Tris		6.06 g
EDTA		148.92 mg
SDS		400 mg
mit konzentriertem HCl auf pH 6.8 bei 25°C einstellen		
Aqua bidest	ad	100 ml

Lösung Lae-B: 4 x Trenngelpuffer
(0.373 M Tris - 1 mM EDTA - 0.1 % (w/v) SDS - pH 8.8)

Tris		18.1 g
EDTA		148.92 mg
SDS		400 mg
mit konzentriertem HCl auf pH 8.8 bei 25°C einstellen		
Aqua bidest	ad	100 ml

Lösung Lae-C: 5 x Laufpuffer
(0.025 M Tris - 0.192 M Glycin - 0.1 % (w/v) SDS -
1 mM EDTA - 0.001 % (w/v) Na-azid - pH 8.3)

Tris		15.1 g
Glycin		72.1 g
SDS		5 g
EDTA		1.8 g
Na-azid		500 mg
Aqua bidest	ad	1000 ml

2.7.1.2.2 Puffersystem nach Neville (1974) modifiziert
(Tris/HCl - Tris/H_2SO_4 - Tris/Borat)

Die Zahlen in Klammern stehen für die Endkonzentrationsangabe der Reagenzien. Die Zahl mit dem X-Zeichen steht für die Vielfachkonzentrationsangabe der Stammlösung.

Reagenzien:

Lösung Nev-A: 4 x Sammelpuffer
(0.0541 Tris - 1 mM EDTA - 0.1 % (w/v) SDS - pH 6.1)

Tris		2.62 g
EDTA		148.92 mg
SDS		400 mg
mit konzentriertem H_2SO_4 auf pH 6.1 bei 25°C einstellen		
Aqua bidest	ad	100 ml

Lösung Nev-B: 4 x Trennpuffer
(0.4244 M Tris - 1 mM EDTA - 0.1 % (w/v) SDS - pH 9.18)

Tris		20.56 g
EDTA		148.94 mg
SDS		400 mg

mit konzentriertem HCl auf pH 9.18 bei 25°C einstellen

Aqua bidest ad 100 ml

Lösung Nev-C: 5 x oberer Troglaufpuffer
(0.04 M Tris - 0.04 M Borat - 0.1 % (w/v) SDS - 1 mM EDTA - 0.001 % (w/v) Na-acid - pH 8.64)

Tris	24.8 g
Borsäure	7 g
SDS	5 g
EDTA	1.86 g
Na-acid	500 mg

mit einer gesättigten Boratlösung auf pH 8.64 bei 25°C einstellen

Aqua bidest ad 1000 ml

Lösung Nev-D: 5 x unterer Troglaufpuffer
(0.4244 M Tris - 1 mM EDTA - 0.1 % (w/v) SDS - 0.001 % (w/v) Na-acid - pH 9.18)

Tris	257 g
EDTA	1.86 g
SDS	5 g
Na-acid	500 mg

mit konzentriertem HCl auf pH 9.18 bei 25°C einstellen

Aqua bidest at 1000 ml

2.7.1.2.3 Herstellung der Gele mit einer linearen Konzentration an Acrylamid

Die Zahlen in Klammern stehen für die Endkonzentrationsangabe der Reagenzien. Die Zahl mit dem X-Zeichen steht für die Vielfachkonzentrationsangabe der Stammlösung.

Reagenzien:

Lösung A: 50 %(w/v) Acrylamid - 1.33 % (w/v) Bisacrylamid

Acrylamid		50 g
Bisacrylamid		1.33 g
Aqua bidest	ad	100 ml

Die Lösung wurde in einem dunklen Gefäß bei 5°C aufbewahrt.

Lösung B: 70 % (w/v) Saccharose

Saccharose		70 g
Aqua bidest	ad	100 ml

Lösung C 1: 40 x (0.1 % (w/v)) Ammonium persulfat für das Sammelgel

Ammoniumpersulfat		400 mg
Aqua bidest	ad	10 ml

C 2: 40 x (0.02 % (w/v)) Ammonium persulfat für das Trenngel

Ammoniumpersulfat		120 mg
Aqua bidest	ad	10 ml

Diese Lösungen wurden täglich frisch angesetzt.

Trenngellösung (143 ml Geldimensionen: 32 cm x 26 cm x 0.15 cm; mit dem Puffersystem z.B. nach Laemmli)

	schwere Lösung mit 16 % (w/v) Acrylamid)	leichte Lösung mit 10 % (w/v) Acrylamid)
Lösung A	21 ml	13 ml
Lösung Lae-B	16.5 ml	16.5 ml
Lösung B	16 ml	9 ml
Aqua bidest (filtriert)	12 ml	27 ml
TEMED	14 µl	28 µl
Lösung C 2	1.1 ml	1.1 ml

Sammelgellösung (20 ml - 4 % (w/v) Acrylamid)

Lösung A	1.5 ml
Lösung Lae-A	5 ml
Aqua bidest (filtriert)	13 ml
TEMED	20 µl
Lösung C 1	0.5 ml

Die eingesetzten Endvolumina für Sammelgel- und Trenngellösungen richten sich nach der Glasplattengeometrie

Die Gele mit dem Puffersystem nach Neville wurden genauso hergestellt.

Routinemäßig wurden Gele mit einem linearen Gradienten an Acrylamid von 10 bis 16 % (w/v) für die 32 cm langen Gele und für die 16 cm langen Gele benutzt.

Der Gradient wurde unterschichtet, und hierfür wurde die leichte Lösung zwischen den Glasplatten als erste hineingepumpt. Die Durchflußrate betrug ca. 4 ml/min, so daß der

Gradient nach ca. 30 min aufgebaut war. Er wurde vorsichtig dann mit einer 3 mm dicken Isobutanolschicht abgedeckt. Das Gel polymerisierte vollständig nach ca. 60 - 70 min bei einer Temperatur von 25 - 30°C, empfohlen nach Gelfi und Righetti (1981). Die Wasser/Butanol-Phase wurde entfernt und die Geloberfläche mit Aqua bidest gespült.

Ein abschließendes Sammelgel von ca. 1 bis 1.5 cm Länge wurde gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach Beendigung des Polymerisationsvorganges bei 25 - 30°C wurden die Gele in feuchten Polyäthylengefrierbeuteln bei 5°C aufbewahrt. Sie wurden frühestens nach 24 Std. in der PAGE eingesetzt und konnten ohne Verschlechterung der Auflösung bis zu ca. drei Wochen so gelagert werden.

Bemerkungen:

1. Der lineare Gradient an Acrylamid wurde mit dem simultanen Aufbau eines Saccharose-Gradienten (9 bis 17 % (w/v) stabilisiert.
2. Ein konträr gerichteter Gradient an TEMED wurde im Trenngel aufgebaut, um eine Vermischung des Gradienten durch thermische Bewegungen während der Polymerisationsreaktion zu vermeiden. In diesem Fall startete die Polymerisation bei 10 % und endete bei 16 % Acrylamid (Chua, 1980).

2.7.1.2.4 Probenaufarbeitung unter denaturierenden Bedingungen

Die Zahlen in Klammern stehen für die Endkonzentrationsangabe der Reagenzien. Die Zahl mit dem X-Zeichen steht für die Vielfachkonzentrationsangabe der Stammlösung.

Reagenzien:

Lösung A: 2.5 x Probenpuffer
(0.050 M Tris - 2 % (w/v) SDS - pH 7.5)

Tris		1.51 g
SDS		5 g
mit konzentriertem HCl auf pH 7.5 bei 25°C einstellen		
Aqua bidest	ad	100 ml

Lösung B: 2.5 x (2.5 mM EDTA, 0.1 % (w/v) DTT)

EDTA		25 mg
DTT		25 mg
Lösung A	ad	10 ml

Lösung C: 25 x (25 mM Jodacetamid)

Jodacetamid		0.57 g
Lösung A		2 ml
Aqua bidest	ad	5 ml

Lösung D: 6.25 x (0.003 % (w/v) Bromphenolblau
10 % (w/v) Saccharose)

Bromphenolblau		2 mg
Saccharose		6 g
Lösung A (1 : 1 verdünnt)	ad	10 ml

Zu 100 µl auf 100°C erhitzte Lösung B wurden 100 µl Probe gemischt. Die Probe wurde 15 min lang bei 100°C gekocht und dann 15 min lang bei 10 000 x g - 25°C - zentrifugiert, um nicht gelöstes Material zu entfernen. Anschließend wurde die Probe mit 10 µl Lösung C versetzt und bei 50°C 15 min lang einer Alkylierungsreaktion unterzogen (um die Reoxidation der (S - DTT) Gruppen zu verhindern(Lane, 1978). Nach der Abkühlung der Probe wurden 40 µl Lösung D hinzupipettiert. Im Durchschnitt wurden z.B. für eine Pink

Envelope-Suspension ca. 140 bis 200 µg Proteine für eine Coomassie-Färbung und 3 bis 6 µg Proteine für eine Silber-Färbung pro Geltasche eingesetzt.

Bemerkung:

Alle im Kapitel 2.7.1.2 beschriebenen Lösungen wurden mit Nucleopor-Filter (Porendurchmesser 1 µm) filtriert. Die Lösungen wurden bei 5°C gelagert und für die Gelherstellung auf Zimmertemperatur (außer dem PAGE-Laufpuffer) gebracht.

2.7.1.3 Gießtechnik für die zweidimensionale Analyse von Gelstreifen

Für diese spezielle Technik wurde die PAGE ausschließlich mit den Plattendimensionen Länge 16 cm, Breite 26 cm, Dicke 0.15 cm durchgeführt. Der lineare Gradient an Acrylamid betrug 10 - 16 % (w/v) für das Peptid-Mapping und 7.5 - 12 % für reversible quervernetzte Proben. Das Sammelgel unterhalb des Gelstreifens erstreckte sich über eine Höhe von insgesamt ca. 1 - 1.5 cm. Der mit Hilfe eines Skalpells aus der ersten PAGE-Dimension herausgeschnittene Gelstreifen war im Durchschnitt 1 cm breit. Der im Puffer äquilibrierte Streifen wurde zuerst auf Fließpapier abgetrocknet und dann auf die innere Seite einer gereinigten Glasplatte quer positioniert (Abb. 1 (C)), so daß auf einer Seite oder beiden (je nach Streifenlänge) Kontrollproben in der PAGE Platz nehmen konnten. Die Distanzstücke wurden lateral platziert, und die abschließende Glasplatte wurde eingesetzt. Die Glasplatten wurden zwischen den U-Schienen festmontiert. Die Gelvorrichtung wurde auf den Gießständer gestellt. Das Trenngel wurde gegossen (siehe Kap. 2.7.1.2.3). Nach der vollendeten Polymerisation wurde die Wasser/Butanol-Phase entfernt und die Geloberfläche des Trenngels sowie der eingeklemmte Gelstreifen (Glasplatte mit dem Polymerisations-

ständer auf Position ② bringen (Abb. 1)) mit Aqua bidest gut gespült (eine Spritze mit einem dünnen festen Schlauch - Durchmesser 1 mm - wurde zu Hilfe genommen). In dieser bleibenden Position ② wurde das Sammelgel gegossen. Ein konkaver Meniskus (Abb. 1, Position ③) bildete sich unterhalb des Streifens und bewegte sich bis zu Position ④, von da an konnte die Position ① wieder eingenommen werden und das Sammelgel zu Ende gegossen werden. Der Kamm wurde abschließend im Sammelgel eingesetzt. Diese Handhabung erlaubte, problemlos das Sammelgel ohne Luftblasen unterhalb des Streifens zu gießen.

Bemerkungen:

1. Diese Gießtechnik wurde für die zweidimensionale Analyse sowohl von Peptid-Mapping-Proben als auch von reversiblen quervernetzten Proben benutzt.

2. Für die zweidimensionale Analyse der quervernetzten Proben wurde auf die übliche Einbettung des Gelstreifens in Agarose (Peters, 1984; Ji, 1983) aus zwei Gründen verzichtet:

   a) Flüssige Agarose erstarrt schnell und verursacht einige Probleme beim Gießen.

   b) Agarose-Gele sind wärmeempfindlich. Sie kollabieren leicht bei einer zu hohen Stromstärke (Joules-Effekt). Das Gel löst sich vom Acrylamidstreifen,und Verzerrungen in den Laufbahnen durch die veränderte Geometrie des Sammelgels sind die Folge.

3. Zwei Arten von Kämmen wurden benutzt. Für Gelstreifen aus kurzen Gelen (16 cm Länge) hatte der Kamm eine mittelgroße Tasche (Höhe 1.5 cm, Breite 14.5 cm), flankiert auf beiden Seiten von jeweils zwei Taschen (Höhe 1.5 cm, Breite 1 cm).

Für Gelstreifen aus langen Gelen (32 cm Länge) hatte der Kamm auf einer Seite eine Tasche (Höhe 1.5 cm, Breite 1 cm) und auf der anderen Seite eine große Tasche (Höhe 1.5 cm, Breite 19 cm).

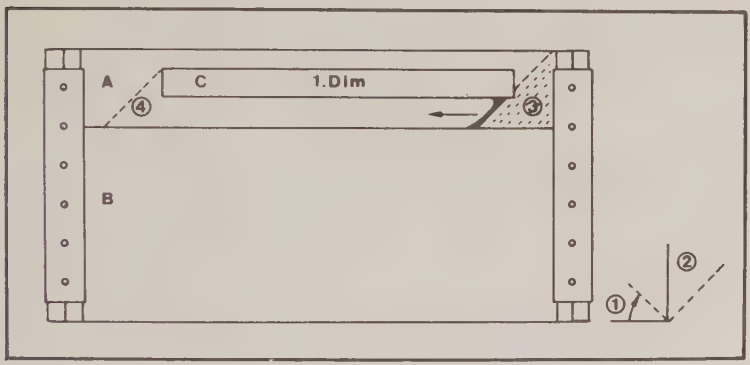


Abb. 1. Schema zur Herstellung eines Gels für zweidimensionale SDS-PAGE. A: Sammelgel; B: Trenngel; C: Gelstreifen der ersten Dimension. Die eingekreisten Nummern kennzeichnen verschiedene Positionen während der Gelherstellung (siehe nähere Beschreibungen im Text).

2.7.2. Präparative Gelelektrophorese

2.7.2.1 Elektroelution von Polypeptiden nach Hunkapiller et al. (1983)

Diese Technik wurde für die Isolierung von aufgetrennten Polypeptiden aus der SDS-PAGE in Mikrogramm-Mengen zur Aminosäuren-Analyse eingesetzt.

Reagenzien:

Lösung A: 1 % (w/v) $NaHCO_3$

Lösung B: 0.1 % (w/v) SDS - 0.1 % (w/v) Na-azid

Lösung C: 10 x Elutionspuffer (0.05 M Tris - 0.1 % (w/v) - SDS - pH 7.8)

Tris		310 g
SDS		1 g
mit konzentriertem HCl auf pH 7.3 bei 25°C einstellen		
Aqua bidest	ad	1000 ml

Lösung D: "Soaking"-Puffer (0.2 M Tris - 2 % (w/v) - SDS - pH 7.8)

Tris		31 g
SDS		2 g
mit konzentriertem HCl auf pH 7.8 bei 25°C einstellen		
Aqua bidest	ad	100 ml

Diese Lösung wurde bei 25°C gelagert.

Lösung E: 100 x 0.1 % (w/v) DTT

Diese Lösung wurde in kleinen Portionen (500 µl) bei -18°C gelagert.

Alle anderen Lösungen wurden bei 5°C gelagert.

Dialysemembranen von Spectrapor (Los Angeles, USA) wurden mit einem "cut-off" von 3500 D benutzt. Die Membranen wurden in Lösung A 30 min lang bei 60°C inkubiert, anschließend 5 min lang in Aqua bidest gewaschen. Sie wurden in Lösung B 60 min lang bei 60°C inkubiert und 5 min lang in Aqua bidest gewaschen. Die gereinigten Membranen wurden mit einem Korkbohrer auf einen Durchmesser von 1.7 cm gestanzt und 5 min lang in Aqua bidest gespült. Sie wurden bei 5°C in Lösung B gelagert.

Die Apparatur für die Elektroelultion stammte von DESAGA (Heidelberg). Sie bestand aus Elutionsröhrchen,mit Mikrokammern (Volumen 0.4 ml) bestückt. Die aus dem SDS-Gel herausgeschnittenen Banden wurden in 20 ml Aqua bidest 10 min lang gewässert. Die Banden wurden in kleine Stückchen (1 mm Kantenlänge) getrimmt. Die Gelstücke wurden auf Filterpapier angetrocknet und in Lösung C 5 min lang bei 25°C inkubiert. Sie wurden anschließend in Lösung D überführt und 60 min lang bei 25°C inkubiert. Die Elutionszellen wurden mit den Mikrokammern und Dialysemembranen bestückt. Die Apparatur wurde mit den Gelstückchen beladen. Die Elutionsröhrchen wurden zum Schluß bis zum Rand mit Lösung D aufgefüllt und mit Lösung E (100 µl/Zelle) versetzt. Die Röhrchen wurden in den Halterungen am oberen Trog befestigt. Die Proben wurden 24 Std. lang elektroeluiert (siehe 2.7.4.2). Nach Beendigung der Elution wurden die Mikrokammern entfernt und über Nacht mit der Dialysemembran auf einem feuchten Filterpapier in einer Petrischale bei 5°C stehengelassen. In Zelladaptoren wurden sie bei 3000 x g - 10 min lang - 20°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Inhalt (400 µl) wurde zur Proteinfällung (siehe 2.5.6.2) bereitgehalten.

2.7.3 Nachweismethoden von Proteinen in Gelen

2.7.3.1 Coomassiefärbung

Reagenzien:

Lösung A:	12 % (w/v) TCA		
Lösung B:	Färbelösung		
	Coomassie Brillant-Blue R-250		1.5 g
	Methanol (purum)		450 ml
	Essigsäure (purum)		100 ml
	Aqua bidest	ad	1000 ml

Lösung C: Entfärber

Methanol (purum)		300 ml
Essigsäure (purum)		100 ml
Aqua bidest	ad	1000 ml

Das zu färbende Gel wurde in Lösung A nach dem Lauf 30 min lang fixiert und anschließend 15 min lang in Aqua bidest gespült, um den Überschuß an Fixierungslösung zu entfernen. Das Gel wurde in die auf 50°C erwärmte Lösung B eingetaucht und 3 bis 4 Std. lang im Färbebad inkubiert. Die Entfärbung fand in Lösung C in der Entfärbungskammer über Nacht statt, bis der Hintergrund klar war. Anschließend wurde das Gel photographiert.

Kurze Färbung:

Nach PAGE-Läufen für präparative Zwecke (z.B Aminosäuren-Analyse) wurden die Gele in Lösung B 30 min lang bei 25°C gefärbt und 30 min lang in Lösung C entfärbt.

2.7.3.2 Silberfärbung nach Wray et al. (1981)

Diese Methode wurde entwickelt, um Polypeptide in 0.8 mm dicken PAG nachzuweisen. Einige Inkubationsschritte und Inkubationszeiten wurden verändert und optimiert für 1.5 mm PAG. Einige Änderungen sollten den gefärbten Hintergrund im Gel nach der Färbung reduzieren (Poehling und Neuhoff, 1981). Fixative Waschgänge stellten sich als notwendig heraus, um dieses Ziel zu erreichen. Hintergrundsbildner wie SDS, Tris/Glycin, Sulfhydryl-Reagens (DTT) wurden so weitgehend aus der Gelmatrix eliminiert (Guevara et al.,1982).

Die Empfindlichkeit der Proteinsilberfärbung zeigte sich als vorteilhaft durch erstens einen geringen Verbrauch an

Probenmaterial, verbunden mit einer verbesserten Auflösung in der SDS-PAGE (erhöhte Bandenschärfe), und zweitens für die zweidimensionale PAGE-Analyse. Die Empfindlichkeit des Färbungsnachweises kann mit radioaktiven Nachweismethoden verglichen werden (Poehling und Neuhoff, 1981). Diese Methode erlaubte eine Färbung, die über einige Tage hinweg stabil blieb (Ochs et al., 1981).

Reagenzien:

Lösung A: 50 % (v/v) Methanol

Lösung B: Ammoniakales Silbereagens

1. $AgNO_3$ 3.2 g
   Aqua bidest ad 16 ml

2. Ammoniak (25 % v/v) 5.6 ml
   NaOH (0.36 % w/v) 84 ml

3. Lösung 2 kräftig rühren lassen und
   Lösung 1 tropfenweise hinzupipettieren
   Aqua bidest ad 400 ml

Lösung C: Entwickler

Citronensäure (1 % w/v) 2.5 ml
Formaldehyd (37 % w/v) 0.26 ml
Aqua bidest ad 500 ml

Nach Beendigung des elektrophoretischen Laufes wurde das Gel in Lösung A fixiert und über 18 Stunden (Badwechsel 6 - 8 x) gewaschen. Anschließend wurde das Gel 5 min lang in Aqua bidest getränkt, um unmittelbar danach in Lösung B 3 20 min lang inkubiert zu werden. Um den Überschuß an Lösung B 3 aus der Gelmatrix zu entfernen, wurde das Gel in Aqua bidest 10 min lang versetzt (Badwechsel 1 x). Das

Gel wurde in Lösung C 20 min lang entwickelt. Der Entwicklungsvorgang wurde in Lösung A gestoppt. Das Gel wurde unmittelbar danach photographiert.

2.7.4 Laufparameter der Elektrophorese

2.7.4.1 PAGE

Die Angaben gelten für Trennungen mit zwei Gelen gleichzeitig.

Plattendimensionen:	320 x 260 x 1.5 mm	160 x 260 x 1.5 mm
① konstante Ausgangsleistung eingestellt auf (*)	15 W/2 Gele	16 W/2 Gele
maximale Ausgangsspannung und Ausgangsstrom eingestellt	2 kV/300 mA	
PAGE-Laufzeit (bis Bromphenolblau das Trenngel erreicht hatte)	1 Std. 30 min	1 Std.
Istwert der Spannung und des Stromes am Ende des Sammellaufes	210 V/70 mA	182 V/91 mA
② konstante Ausgangsleistung neue eingestellt auf	30 W/2 Gele	32 W/2 Gele
PAGE-Laufzeit (bis Bromphenolblau aus dem Trenngel heraus lief)	14 - 16 Std.	6 Std.
Istwert der Spannung und des Stromes am Ende des Trenngellaufes	556 V/55 mA	400 V/80 mA
konstante Laufpuffertemperatur	11°C	
Netzgerät	Desatronic 2000/300 (DESAGA, Heidelberg)	

NB: Die Elektrophorese wurde bei den 7.5 % - 12 % Acrylamidgrandientgelen beendet, wenn sich die Bromphenolblaufront ca. 0.5 cm vor dem Gelende befand.

2.7.4.2 Elektroelution

Die Elektroelution wurde mit den folgenden Parametern durchgeführt:

Anzahl der Röhrchen mit Mikrokammern pro Lauf	4
konstante Ausgangsleistung eingestellt auf	14 W (3.5 W/Röhrchen)
maximale Ausgangsspannung und Ausgangsstrom eingestellt auf	2 kV/300 mA
Elektroelutions-Laufzeit	24 Std.
Istwert der Spannung und des Stromes beim Start	50 V/267 mA
am Ende	55 V/244 mA
konstante Laufpuffertemperatur	15°C
Netzgerät	Desatronic 2000/300 (DESAGA, Heidelberg)

(*) Elektrophoretische Läufe bei konstanter Leistung sind von Vorteil. Der Joule-Effekt wird geschwächt (Poduslo, 1981).

2.7.5 Computer-unterstützte Auswertungsmethoden für die PAGE

2.7.5.1 Bestimmung von apparenten Molekulargewichten

2.7.5.1.1 Theoretischer Hintergrund

Das apparente Molekulargewicht (MG) von Proteinen kann mit der PAGE in Anwesenheit von SDS als anionisches Detergens ermittelt werden (Shapiro et al., 1967; Weber und Osborn, 1969). SDS bindet an die Proteine und bewirkt eine Dissoziation in die einzelnen Polypeptidkomponenten. Die Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes beruht im wesentlichen auf zwei Faktoren:

a) Die Proteine sind im allgemeinen mit 1.2 - 1.4 g SDS pro g Protein gesättigt (Tanford und Reynolds, 1976; Reynolds und Tanford, 1970). In diesem Zustand sind die Proteine negativ geladen, d.h. die eigenen Ladungen der Proteine sind durch die des Detergenses markiert.

b) Der SDS-Proteinkomplex nimmt eine entknäuelte Gestalt an. Die Größe dieser Struktur ist annähernd proportional zu dem Molekulargewicht der Polypeptidkette (Reynolds und Tanford, 1970).

Störende Faktoren:

Ein störender Faktor ist eine anormale SDS-Bindung. Dies wird beobachtet:

a) bei Glycoproteinen, Lipoproteinen und Membranproteinen (Capaldi, 1977; Hjelmeland und Chrambach, 1981)

b) durch die Konformationsfreiheit der Proteine

c) durch eine nicht ausreichende oder fehlende Reduzierung der Disulfidbrücken.

Alle diese Störungen führen zu einer Fehleinschätzung des apparenten Molekulargewichts. Der Molekularsiebeffekt im Gradienten kompensiert zum Teil eine eventuelle anormale SDS-Bindungsrate der Proteine. Das ermittelte Molekulargewicht nähert sich so dem reellen Wert (Poduslo und Rodbard, 1980).

2.7.5.1.2 Auswahl der Markerproteine

Markerproteine (Biorad, 1983)	MG (kD)
Myosin	200
ß-Galactosidase	116.5
Phosphorylase B	92.5
Bovine-Serum-Albumin (BSA)	66.2
Ovalbumin	45
Carbonic-Anhydrase	31
Trypsin-Inhibitor	21.5
Lysozym	14.4

2.7.5.1.3 Aufstellung der Eichkurve

Die Eichkurve wurde nach der Beziehung log (MG) = a log (T %) + b aufgestellt (Lambin, 1978; Poduslo und Rodbard, 1980). T in % ist die erreichte Polyacrylamidkonzentration eines Polypeptids im PAGE-Gradienten. Die Eichkurvenanpassung wurde mit einem Linearregressionsprogramm ermittelt (Karrenberg, 1981). Die apparenten Molekulargewichte von typischen intrinsischen Membranproteinen wie Bacteriorhodopsin und OmpF aus *Escherichia coli* K 12 konnten mit diesem PAGE-System und dieser Auftragungsart mit großer Zuverlässigkeit ermittelt werden (Karrenberg, 1981).

Weiterhin zeigten die Eichkurven einen Korrelationskoeffizienten von r = 0.995 - 0.997 und eine Molekulargewichtstandardabweichung von ± 6.80 % (Karrenberg, 1981). Dreißig Gele wurden zur Ermittlung der apparenten Molekulargewichte der Polypeptide herangezogen.

2.7.5.1.4 Digitale Aufarbeitung der Gelmuster

Die Auswertung wurde ausschließlich an PAGE-Photos durchgeführt. Die Laufstrecken jedes einzelnen Polypeptids wurden mit Hilfe eines Digitizers (HP 9111 A Graphic Tablet) digitalisiert und mit Hilfe eines Tischrechners HP 85 (Hewlett Packard) auf Magnetbänder aufgezeichnet. Die Laufstreckenweite (in cm) wurde mit Hilfe eines modifizierten HP-Programms (AR & Dis Program HP Greeley Division 3404 E. Harmony Road, Ft. Collins, CO 80525 (USA), 1980) in T % konvertiert. Das Programm wurde mit dem Regressionsprogramm verknüpft und erlaubte den sofortigen Output der apparenten Molekulargewichte.

2.7.5.2 Quantitative Messungen an Proteinbanden in PAG nach Stanley und Pitt (1983)

Photographien der Elektropherogramme wurden mit einer Video-Kamera digitalisiert und auf Magnetband aufgezeichnet. Die Quantifikation der Proteinbanden wurde mit dem Semper-Bildverarbeitungssystem durchgeführt (Saxton et al., 1979). Diese Technik hat den Vorteil, daß alle Probenläufe auf der Photographie simultan digitalisiert werden und somit eine schnelle Aufzeichnung aller Informationen auf dem Gel erfolgt.

Hinzu kommt der Vorteil, daß diese Auswertungsart nicht sofort nach Beendigung eines PAGE-Laufes durchgeführt werden muß.

Die digitalisierten Aufnahmen wurden mit dem Semper-System auf einem Digital Vax 11/730 Rechner (Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München) analysiert. Das Programm erlaubte eine manuelle Subtraktion des Gelhintergrundes und hiermit eine Korrektur der Baseline.

Ausschließlich Coomassie-gefärbte Gele wurden zur Analyse herangezogen. Die Silberfärbung in der präsenten Form erlaubt keine stöchiometrische Färbung von Proteinen. Die Färbungsintensität zeigt keine lineare Beziehung zu der Proteinmasse (Poehling und Neuhoff, 1981).

2.7.5.3 Digitale Aufarbeitung der zweidimensionalen Peptide-Mapping-Aufnahme

Die Photographien der zweidimensionalen Peptide-Elektropherogramme wurden mit einer Video-Kamera aufgenommen, die Aufnahmen digitalisiert und auf Magnetband aufgezeichnet. Die Bildverarbeitung wurde mit dem Programm GELKORIX von Dr. R. Guckenberger (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) durchgeführt.

Das Programm bestimmt die Position von Kolonnen und der darin enthaltenen Banden und berechnet dann den Grad der Übereinstimmung (Korrelation) der Bandenmuster von je zwei Kolonnen. Alle gefundenen Kolonnen und Bandenpositionen werden zunächst in Listen gespeichert. Die Positionen der Banden, gemessen von Anfang des Trenngels her, entsprechen den Mobilitäten der Banden. Da das Trenngel geometrisch verzerrt ist, müssen die gefundenen Positionen noch entsprechend dieser Krümmung des Anfangs des Trenngels korrigiert werden. Für die Korrelation wird im Computer wieder synthetisch ein Gel erzeugt, das in Laufrichtung des Gels geometrisch (bis auf die genannte Korrektur) dem ursprünglichen Gel entspricht, in dem jedoch die Kolonnen äquidistant (quer zur Laufrichtung) eingeführt sind. Die Stärke der Banden wurde für alle Banden gleichgesetzt und

die Bandenbreite auf 2 Pixel festgelegt. Eine gewisse Bandenbreite muß zugelassen werden, da die exakte Position einer Bande prinzipiell nicht auf 1 Pixel genau zu bestimmen ist. Um restliche Fehler in der vorgenommenen Verzerrungskorrektur der Bandenpositionen auszugleichen, wird die Korrelation für einige y-Verschiebungen der zu vergleichenden Kolonne (gegen die Laufrichtung des Gels, standardmäßig $\pm$ 1 Pixel) getestet und die Daten für den höchsten Wert der Übereinstimmung aufgezeichnet. Der Output solcher Berechnungen ist in Tafel 25 und Tafel 28 dargestellt. Die Tabelle (siehe z.B. Tafel 28, Abb. C) gibt das Ergebnis der Korrelation in Prozentzahlen wieder. In der Diagonale der Tabellen stehen die (mit 100 multiplizierten) Nummern der (durchnumerierten) Kolonnen. Oberhalb stehen die Werte der Übereinstimmung einer Kolonne (Nr = Spaltennummer) mit der Referenzkolonne (Nr = Zeilennummer) bei Normierung durch die größere Anzahl an Banden in den beiden Kolonnen. Unterhalb der Diagonale stehen die Zahlen bei Normierung durch die kleinere Anzahl an Banden beider Kolonnen, wobei hier die Nummer der Referenzkolonne aus der Spaltennummer und die der korrelierten Kolonne aus der Zeilennummer ergibt. Bei der Bestimmung der Anzahl der Banden in der Referenzkolonne wird nur der Bereich ab Höhe der Startposition der zu vergleichenden Kolonne herangezogen. Dieser Schritt erwies sich als notwendig, um Kolonnen aus hochmolekularen und niedermolekularen Polypeptiden sinnvoll zu vergleichen. Die so reduzierte Bandenzahl der Referenzkolonne ist in der zweiten Tabelle oberhalb der Diagonale aufgetragen. Unterhalb der Diagonale in dieser Tabelle finden sich die y-Verschiebungen, bei denen maximale Übereinstimmung der jeweils betrachteten Kolonnen (zwei) erreicht wird. Ist diese Verschiebung überhaupt nicht (falls überhaupt keine Übereinstimmung erreicht wird) oder nur schlecht definiert (wenn die gleiche maximale Übereinstimmung für

(stark) unterschiedliche Verschiebungen erreicht wird), so erscheint die Zahl 99 in der Tabelle. Die gesamte Bandenzahl jeder einzelnen Kolonne erscheint unterhalb der Tabelle.

Die Auswertungsmethode sollte als Hilfsmittel zur Ermittlung von Homologie zwischen einzelnen Polypeptiden dienen. Ein Korrelationswert von $\geq$50 % zwischen zwei Kolonnen spricht für eine hohe Anzahl von Banden mit der gleichen Mobilität. Dieser Hinweis verlangt dann eine optische Beurteilung des Bandenmusters jeder dieser Kolonnen (z.B. Form und Färbungsintensität der Banden), um eine Aussage über eine Homologie treffen zu können. Alle Arbeiten wurden mit einem Digital Vax 11/730-Computer des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried (bei München) durchgeführt.

Die nachfolgende Tabelle 1 faßt die Arbeitsschritte des GELKORIX-Programms zusammen.

"File Name"	Funktion
GENDIS	Display des digitalisierten Originalbildes
GELKOOR	interaktives Ausmessen des Gels: Koordinaten zur Herstellung eines geeigneten Bildausschnitts (Diagonaleckpunkte, tiefstgelegenes Kolonnenende, Anfang des Trenngels)
GELKOLOSU	automatische Kolonnensuche (eine Kolonne wurde definiert als das erzeugte Bandenmuster eines Polypeptids)
interaktive Kontrolle über die Kolonnen	
KOLODIS	Display der automatisch gefundenen Kolonnen
KOLODEL	Kolonne löschen
KOLOINS	Kolonne hinzufügen
KOLOSORT	Kolonnen in richtiger Reihenfolge in Kolonnenliste einsortieren
GELBASU	automatische Bandensuche innerhalb der vorgegebenen Kolonnen
interaktive Kontrolle über die Banden	
BANDIS	Display der automatisch gefundenen Banden
BANDEL	Banden löschen
BANINS	Banden hinzufügen
BANSORT	Banden in richtiger Reihenfolge in Bandenlisten einsortieren
GELBINBA	Felderzeugung für Korrelation. Berücksichtigung der Krümmung des Anfangs des Trenngels
GELKORR	Korrelation der Kolonnen miteinander

Tabelle 1: Liste der Kommandos des GELKORIX-Programms mit deren zugehörigen Funktionen

2.8 Peptide Mapping

Die elektrophoretische Mobilität genügt nicht, um eine sichere Aussage über verwandtschaftliche Beziehungen zweier oder mehrerer Polypeptide machen zu können. Fälle, in denen ein größeres und ein kleineres Polypeptid in Beziehung zueinander stehen, dadurch daß beide aus dem gleichen Urpolypeptid stammten oder deren unterschiedliche Mobilität auf eine *in vitro* stattgefundene Proteolyse zurückzuführen war oder deren Mobilität durch eine chemische Modifikation wie eine Glykosylierung verursacht wurde, fordern eine genauere Analyse.

Jedes individuelle Polypeptid muß weiteren chemischen Untersuchungen unterzogen werden. Als methodische Grundlage diente die von Cleveland et al. (1977) beschriebene Technik des Peptide Mapping. Diese biochemische Methode ermöglicht die Analyse über Homologie zwischen Polypeptiden, die durch die SDS-PAGE gewonnen wurden. Diese Analyse sollte eine Antwort auf die Frage geben, ob zwei oder mehrere Proteine homolog oder unterschiedlich sind.

Bei der Cleveland-Methode werden die Polypeptide mit spezifischen Proteinasen in Anwesenheit von SDS begrenzt verdaut. Die so gespaltenen Polypeptide werden elektrophoretisch aufgetrennt. Das Spaltmuster ist für das Polypeptid (= Substrat) und das gewählte Enzym charakteristisch. Anhand der im PAG dargestellten Spaltprodukte wird der Vergleich zwischen den erhaltenen Verdauungsmustern (u.a. über die Mobilität der Banden) vollzogen. Einige Probleme sind mit dieser Methode assoziiert:

a) Als Färbung kann Coomassie verwendet werden, dadurch ist die eingesetzte Substratmenge relativ hoch. Autoradiographie, Fluorographie von radioaktiven Polypeptiden sorgen für einen empfindlicheren Nachweis, verlangen weniger Ausgangsmaterial, aber mehr Zeit. Die Silberfärbung zeigt das benutzte Enzym im Elektropherogramm und erschwert die Auswertung (Lischwe und Ochs, 1982).

b) Das Konzentrationsverhältnis zwischen Substrat und Enzym muß für jedes neue Polypeptid ad novum ermittelt werden.

c) Polypeptide, kleiner als 15 kD, lassen sich schwer oder nicht proteolytisch angreifen (Karrenberg, 1980; Baumeister et al., 1982; Rachel et al., 1983).

Die chemische Spaltungsmethode von Proteinen mit CNBr im Gel wurde schon eingesetzt (Lonsdale-Eccles et al., 1981; Pepinsky, 1983). Diese Polypeptid-Analyse, in der CNBr Peptidbindungen hinter Methionin spezifisch spaltet, verlangt lange Reaktionszeit, 2 - 48 Std. (Lischwe und Ochs, 1982).

N-Chlorosuccinimid (NCS) spaltet Peptidbindungen spezifisch hinter Tryptophan, die Reaktion verlangt nur 30 min (Lischwe und Ochs, 1982).

Die chemischen Spaltungen zeigen wesentliche Vorteile:

a) Die Reaktionsspezifität ist unabhängig vom Reaktionspartner (Polypeptid). Eine hohe Reproduzierbarkeit ist gewährleistet.

b) Empfindliche Färbungs- und Nachweismethoden können ohne Einschränkung eingesetzt werden.

2.8.1 Beschreibung der Methode nach Lischwe und Ochs (1982)

Reagenzien:

Lösung A: Harnstoff/Aqua bidest/Essigsäure

Harnstoff	500 g
Aqua bidest	500 ml
Essigsäure (purum)	500 ml

Lösung B: N-Chlorosuccinimid - Lösung (NCS)

NCS 0.2 g
Lösung A ad 100 ml

Lösung C Äquilibrierungspuffer

(3 % v/v) Glycerin - (0.5 % w/v) DTT -
(3 % w/v) SDS - (0.5 M) Jodacetamid -
gelöst in (0.062 M) Tirs/HCl-Puffer - pH 6.8

2.8.2 Eindimensionales Peptide Mapping

Die aus dem Gel herausgeschnittenen Banden wurden zuerst in 25 ml Aqua bidest 20 min lang (Badwechsel 2 x) gewaschen. Anschließend wurden sie in 10 ml Lösung A 20 min lang (Badwechsel 2 x) inkubiert, um danach in 5 ml Lösung B 30 min lang inkubiert zu werden. Nach der spaltenden Behandlung wurden sie in 25 ml Aqua bidest 20 min lang (Badwechsel 2 x) getränkt. Schließlich wurden die Gelstückchen in 10 ml Lösung C 90 min lang (Badwechsel 3 x - das letzte Bad ohne DTT-Zusatz) äquilibriert. Die Banden wurden mit einer Pinzette in den Geltaschen zwischen den Glasplatten eingeklemmt. Die PAGE wurde unter den Standardlaufbedingungen (2.7.4.1) gestartet.

2.8.3 Zweidimensionales Peptide Mapping

Diese technische Abhandlung des Peptide Mapping wurde schon von Eagles et al. (1981) beschrieben und auch von Rachel et al. (1983) eingesetzt. Diese zweidimensionale Analyse erlaubt das vollständige Peptide Mapping eines komplizierten Bandenmusters auf einen Blick. Für diese Untersuchungen wurden die Gelstreifen und die Gelstückchen gleich behandelt (2.8.1 und 2.8.2). Alle

Schritte wurden mit erweiterten Volumen in Petrischalen durchgeführt. Die Gelstreifen wurden anschließend wie in 2.7.1.3 für die PAGE vorbereitet und schließlich mit den Standardparametern (2.7.4.1) elektrophoresiert.

2.8.4 Auswertung und Grenze der Methode

Folgende Punkte sollten für die Untersuchungen beachtet werden:

1) Wenn zwei oder mehrere Polypeptide homolog sind, so zeigen sie die gleichen Spaltmuster und gleichen Mobilitäten im Gel.

2) Wenn zwei oder mehrere Polypeptide unterschiedlich sind, dann erhält man unterschiedliche Spaltprodukte mit ungleichen Mobilitäten im Gel.

3) Zur Auswertung sollten zwei wesentliche Vergleichskriterien herangezogen werden:
   a) die Bandenlage der Spaltfragmente (Mobilität : MG app.)
   b) die Erscheinungsform und Intensität der Banden in der PAGE.

4) Wenn zwei verschiedene Polypeptide gleicher Herkunft einem Peptide Mapping unterzogen werden und das gleiche Spaltmuster ergeben, sollte die Eventualität einer oligomeren Beziehung geklärt werden, bevor die Diagnose einer Homologie festgelegt wird.

5) Homologe Fragmente im Spaltmuster der Analyse, d.h. Fragmente, die das gleiche Molekulargewicht aufweisen, aber dennoch eine verschiedene Aminosäuresequenz haben, können eine Identität verfälschen.

2.9 Biochemische Methoden der topographischen Analyse

2.9.1 Schonende Detergenssolubilisierung

2.9.1.1 Ziele der Methode

Membranproteine werden in zwei Kategorien eingeteilt:

(1) periphere Membranproteine (oder Membran-assoziierte Proteine) und
(2) intrinsische Membranproteine (Helenius und Simons, 1975).

Zu (1) Periphere Proteine können, frei von Lipiden, durch Chelatereagenzien, Verringerung oder Erhöhung der Ionenstärke oder des pH's ohne Desintegration der Lipidmatrix, isoliert werden (Helenius und Simons (1975).

Zu (2) Intrinsische Proteine sind durch ihre meistens amphiphile Natur (sie bestehen aus definierten hydrophilen und hydrophoben Regionen) stärker an die Lipidmembran gebunden. Sie können nur durch Detergenzien oder organische Solventien aus ihrer Lipidumgebung entfernt werden (Singer, 1974; Van Renswoude und Kempf, 1984).

Native Membranproteine sind oft *in situ* in einer nicht kovalenten Form mit sich selbst oder mit anderen komplexiert. Eine milde und schonende Solubilisierung mit Hilfe von Detergenzien erlaubt die Extraktion, die Charakterisierung und damit den Zugang zu solchen Produkten (Tanford und Reynolds, 1976). Jedes Membranprotein hat einen individuellen Solubilisierungscharakter gegenüber dem Detergens und wird hierdurch charakterisierungsfähig (Helenius und Simons, 1975; Hjelmeland und Chrambach, 1984).

Eine Möglichkeit zur topographischen Aussage besteht, indem nach der Solubilisierung der Membrankomponente die Protein-Detergenz-Micellen zuerst durch Chromatographie oder durch Elektrophorese in einer nicht denaturierenden Weise fraktioniert werden, um letztlich in der denaturierenden Elektrophorese untersucht zu werden (Peters, 1984). Die erhaltenen Resultate müssen mit Vorsicht interpretiert werden, denn Artefakte sind möglich:

a) Mehrere unterschiedliche Membranproteine können über einen ähnlichen Solubilisierungseigenschaften verfügen und gemeinsam aus der Membran extrahiert und fraktioniert werden, ohne deshalb *in situ* miteinander zu komplexieren.

b) Eine komplette Delipidation garantiert keineswegs, daß Proteinmoleküle von nun an sich in Lösung befinden. Sehr oft sind Protein-Protein-Interaktionen noch präsent. Diese Situation kann relevant für die Proteine in ihrer nativen Situation in der Membran sein (Hjelmeland und Chrambach, 1981).

Bei dieser Arbeit wurden die Solubilisate sowohl bei 25°C wie bei 100°C in Anwesenheit von SDS elektrophoretisch untersucht. Die Fraktionierung wurde ausschließlich mit der Phasentrennungsmethode vollzogen (siehe 2.9.1.3.2). Das Detergenz Triton X-114 wurde hierfür verwendet. Diese Methode besitzt die Eigenschaft, intrinsische von peripheren Membranproteinen zu trennen (Van Renswoude und Kempf, 1984, Bordier, 1982).

Zusammenfassend:

Diese Experimente sollten Auskünfte über folgende Punkte erteilen:

a) den individuellen Charakter eines Membranproteins (peripher, intrinsisch)

b) eine Erfassung der lokalen, morphologischen Veränderungen, verursacht durch die Wirkungsweise der Extraktion mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Einbettung, Metallbedampfung)

c) charakteristische Isolierungsbedingungen einzelner Membranproteine für spätere präparative Zwecke (für Struktur-, Funktionsuntersuchungen).

2.9.1.2 Solubilisierungskriterien

Solubilisierung bedeutet, per Definition, die Desintegration des Lipidbilayers einer Membran in seine Bestandteile (Van Renswoude und Kempf, 1984) (siehe Abb. 2). Es gibt keine generell anerkannten Solubilisierungskriterien. Die Kennzeichen sind meistens operativ (Helenius und Simons, 1975). Die Kriterien sind experimenteller Natur und basieren üblicherweise auf einer Verringerung der Trübung der membranhaltigen Suspension, einer Abnahme des sedimentierenden Materials und dem Verschwinden der Membrandoppellinie auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen eines Ultradünnschnittes.

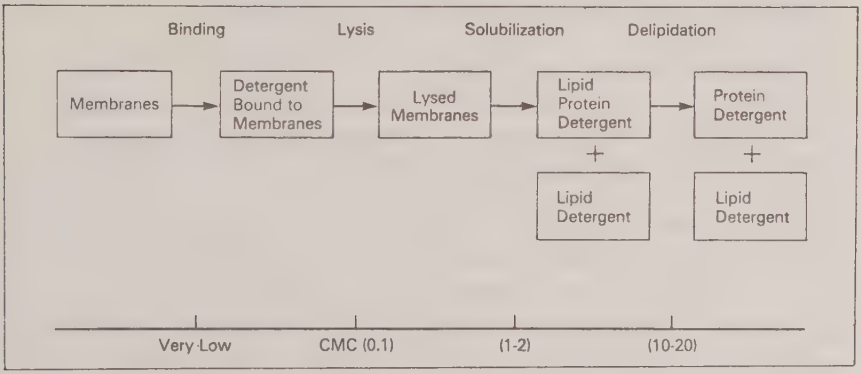


Abb. 2: Das Diagramm erläutert die unterschiedlichen Phasen einer Membransolubilisierung in Abhängigkeit des Detergens/Protein-Verhältnisses (Auszug aus Hjelmeland und Chrambach, 1981).

Zusammenfassend:

Die Solubilisierung fordert die Berücksichtigung von folgenden Parametern:

(a) Wahl des Detergens (ionisch, nicht-ionisch, kritische Micelle-Konzentration: CMC)
(b) Detergens/Protein-Ratio
(c) Puffer (Pufferkapazität, pH)
(d) Ionenstärke (Begleitionen)
(e) Solubilisierungstemperatur und Solubilisierungszeit.

Zwei Kategorien von Detergenzien wurden ausgewählt und experimentiell eingesetzt:

Erstens: Nicht-ionische Detergenzien, die überlicherweise die Proteine nicht denaturieren (die tertiäre und quartäre Struktur bleibt intakt). Sie können eingesetzt werden, um Proteine in ihrer nativen Form zu gewinnen. Sie unterbinden die Lipid-Lipid- und Lipid-Protein-Wechselwirkung in der Membran, aber sind unfähig, die Protein-Protein-Interaktion zu brechen (Helenius et al., 1979).

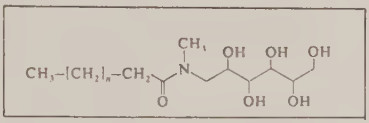
Zweitens: Zwitter-ionische Detergenzien, die auch eine schonende Solubilisierung erlauben. Sie sind polarer und effektiver, um die Protein-Protein-Interaktion zu unterbinden (Helenius et al., 1979).

Zu jedem Experiment wurden die eingesetzten Detergenzien auch mit Begleitionen (Counterionen) von unterschiedlichen Wertigkeiten und Ionenstärken versetzt. Die Ionen wirken auf zwei Ebenen: erstens unterbinden sie die polaren Protein-Protein-Wechselwirkungen (die nicht hydrophobisch sind) (Hjelmeland und Chrambach, 1981); zweitens üben sie vor allem bei ionischen Detergenzien einen Einfluß auf die CMC und die Micellgröße in Abhängigkeit von ihrer Konzentration aus (Helenius et al., 1979; Wennerström und Lindman, 1979).

2.9.1.3 Nicht-ionische Detergenzien

2.9.1.3.1 MEGA-10: decanoyl-N-methylglucamid

Diese neue N-D-Gluco-N-methylalkanamid-Detergens-Klasse wurde von Hildreth (1982) eingeführt. Die chemische Formel lautet:



mit n = 7 für das decanoid-säure Derivat. Dieses Detergens ist effizienter als Nonidet P 40, Triton X-100, Brij-96 (Hildreth, 1982). Diese Detergensklasse wurde für Reinigung und Extraktion von Membranproteinen eingesetzt (Michel, 1984).

Reagenzien:

Stammlösungen: (Werte in Klammern entsprechen der Endkonzentration im Versuch)

Lösung A: Solubilisierungspuffer:
(25 mM) Tris/HCl - pH 7.8

Lösung B: 16 x - (0.5 % (w/v) MEGA 10
Detergens in Lösung A gelöst

Lösung C: 10 x - (15 mM) $CuCl_2$
(Begleition) in Lösung A gelöst

Lösung D: 20 x (150 mM) NaCl
(Begleition) in Lösung A gelöst

Lösung E: 500 x - (2 mM) PMSF
in Essigsäureäthylester gelöst

Lösung F: Probe (ganze Bakterien, Pink Envelope) mit 1 - 2 mg Proteinen/ml Lösung A

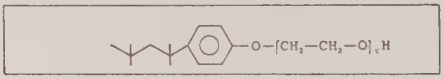
Die jeweiligen Ansätze wurden wie folgt behandelt:

Versuch 1: Lösung F + Lösung E + Lösung B
Versuch 2: Lösung F + Lösung E + Lösung B + Lösung C
Versuch 3: Lösung F + Lösung E + Lösung B + Lösung D

Jeder Ansatz wurde bei 4°C und 30°C eine Stunde lang im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 10 000 x g - 4°C oder 30°C - 20 min lang zentrifugiert, und der Überstand wurde für die PAGE-Analyse aufgehoben. Die Detergens/Protein-Ratio betrug 5 : 1 (w/v).

2.9.1.3.2 Triton X-114: Alkylphenylpolyoxyethylen

Dieses Detergens der Triton X-Serie, dessen chemische Formel hier wiedergegeben ist:



mit x = 7 bis 8 (Triton X-100 : x = 9 bis 6) hat ein besonderes Merkmal. Es ist nur löslich bei 0°C, kondensiert und macht eine Phasentrennung bei Temperaturen über 20°C. Man beobachtet dann eine obere wässerige Phase und eine untere reine Detergensphase. Dieses Phänomen nutzte Bordier (1981), um einerseits Membranproteine bei 0°C zu solubilisieren und andererseits durch die Kondensation bei 30°C hydrophile und hydrophobe Proteine voneinander zu trennen. Die hydrophilen Proteine befinden sich in der wässerigen Phase, während die hydrophoben in der Detergensphase versammelt sind. Periphere Membranproteine können sich in beiden Phasen befinden (Bordier, 1981).

Das kommerziell erhaltene Triton X-114 wurde, wie von Bordier (1982) beschrieben, zuerst vorkondensiert, um die meisten hydrophilen Moleküleinschlüsse zu entfernen. Am Ende der dreifachen Kondensation betrug die Konzentration der Detergensstammlösung 24 % (v/v).

Reagenzien:

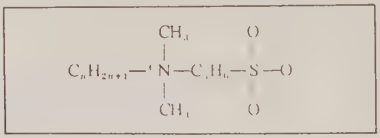
Lösung A:	Solubilisierungspuffer (10 mM) Tris/HCl - pH 7.8
Lösung B:	24 x - (1 % v/v) Triton X-114 Detergens in Lösung A gelöst
Lösung C, D, E:	wie bei 2.9.1.3.1
Lösung F:	Probe (GB, PE) mit 1 mg Protein/ml Lösung A

Die jeweiligen Proben wurden mit den entsprechenden Reagenzien, wie in 2.9.1.3.1 beschrieben, für die Versuche vorbereitet. Die Proben wurden unter Rühren bei 0°C im Eisbad 1 Stunde lang inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 10 000 x g - 0°C - 20 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Kondensation aufgehoben. Der Kondensationsschritt wurde ohne Veränderungen, wie von Bordier(1982) beschrieben, durchgeführt. Die einzeln abgetrennten Phasen wurden aufgehoben und für die PAGE-Analyse bereitgehalten. Die Detergens/Protein-Ratio betrug 40 : 1 (v/w).

2.9.1.4 Zwitterionische Detergenzien

2.9.1.4.1 SB-12: Sulfobetaine (SBn) = 3-(alkyldimethyl-ammonio)-1-propanesulfonate

Dieses Detergens wurde von Gonenne und Ernst (1978) zuerst eingeführt. Die Solubilisierungswirkung ist effizienter mit längerer Alkylkettenlänge (n). Die größte Alkylkette ($n \geq 12$) stellte sich als solubilisierungsfähiger als die Polyoxyethylen-Detergenstypen (Gonenne und Ernst, 1978) heraus. Die gesamte chemische Formel lautet:



mit n = 12 (für die hiesigen Versuche).

Reagenzien:

Lösung A: Solubilisierungspuffer
(25 mM) Tris/HCl - pH 7.8

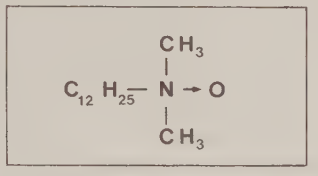
Lösung B: 4 x (2 % w/v) SB-12
Detergens in Lösung A gelöst

Lösung C,D,E,F: wie bei 2.9.1.3.1

Die Proben wurden in der gleichen Weise wie in 2.9.1.3.1 vorbereitet. Sie wurden anschließend bei 4°C und 30°C 1 Stunde lang bei ständigem Rühren im Wasserbad inkubiert. Zuletzt wurden die Proben bei 10 000 x g, 4°C oder 30°C, 20 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde für die PAGE-Analyse aufgehoben. Die Detergens/Protein-Ratio betrug 20 : 1 (w/w).

2.9.1.4.2 LDAO: N,N-dimethyllaurylamidoxid

Das Detergens LDAO hat folgende chemische Gesamtformel:



Es wurde mit Erfolg als potentes Solubilisierungsreagenz mit mildem Charakter eingesetzt, um Membran-Enzymkomplexe zu isolieren, z.B. den Light Harvesting Bacteriochlorophyll-Protein-Komplex von *Rhodopseudomonas capsulata* (Feick und Drews, 1978), den Proteinbacteriochlorophyll-Komplex (reaction center) von *Rhodopseudomonas spheroides* (Okamura et al., 1974).

Reagenzien:

Lösung A:	Solubilisierungspuffer (25 mM) Tris/HCl - pH 7.8
Lösung B:	30 x - (1 % w/v) LDAO Detergens in Lösung A gelöst
Lösung C,D,E,F:	wie bei 2.9.1.3.1

Die Proben wurden in der gleichen Weise wie in 2.9.1.3.1 vorbereitet. Sie wurden anschließend bei 30°C 1 Stunde lang bei ständigem Rühren im Wasserbad inkubiert. Schließlich wurden die Proben bei 10 000 x g - 30°C - 20 min lang zentrifugiert. Das Solubilisat wurde für die PAGE-Analyse bereitgehalten. Die Detergens/Protein - Ratio betrug 10 : 1 (w/w).

2.9.2 Die reversible chemische Vernetzung

Vernetzungsreagenzien waren von experimentellem Nutzen, um das räumliche Arrangement von Proteinen im Enzymkomplex (Coggins et al., 1976), in komplexen Strukturen wie Ribosomen (Peretz et al., 1976; Wittmann, 1976) und in Membransystemen (Steck, 1972; Wang und Richards, 1974; Reithmeier und Bragg, 1977; Paloa, 1979; Angus und Hancock, 1983; Jay et al., 1984; Peters und Drews, 1983, Peters, 1984) zu analysieren. Die nicht kovalenten Bindungen, die solche Strukturen zusammenhalten, werden üblicherweise während der denaturierenden Solubilisierung mit Detergens zerstört. Vernetzermoleküle (Cross-linker) verhindern diese Zerstörung dadurch, daß sie die Komponente eines Komplexes kovalent binden. Eine Nachbarschaftsstudie dieser Proteine wird hiermit und mit Hilfe von analytischen Trennmethoden möglich. Für diesen Zweck sind unterschiedliche Vernetzermoleküle von unterschiedlichen Längen und mit variablen reaktiven funktionellen Gruppen (wie spaltbare, nicht spaltbare, photoreaktive Vernetzer für einen Gesamtüberblick (siehe Peters und Richards, 1977; Das und Fox, 1979; Ji, 1983) hergestellt worden. Für Nachbarschaftsstudien sind spaltbare Vernetzerreagenzien gegenüber nicht spaltbaren von Vorteil. Die Vernetzungsprodukte können auf ihre Zusammensetzung hin analysiert werden. Die Einführung dieser Klasse von spaltbaren Reagenzien durch Wang und Richards (1974), Sommer und Traut (1974), Lutter et al. (1974) und die Entwicklung der zweidimensionalen PAGE sorgten für die Determination der Vernetzungsprodukte.

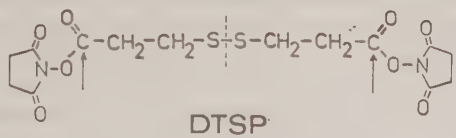
2.9.2.1 Das Vernetzungsagent DTSP

Diese Vernetzungsreagens wurde von Lomant und Fairbanks (1976) eingeführt und später oft verwendet (Smith und Capaldi, 1977; Reithmeier und Bragg, 1977; Jay et al., 1984;

Peters und Drews, 1983; Peters, 1974). Es gilt als Alternative zu DTBP (Ji, 1983) und ist effizienter in der Reaktion (Peters und Drews, 1983). (Versuche mit DTBP an der Pink Envelope von *Deinococcus radiodurans* Sark zeigten eine geringere Ausbeute an Vernetzungsprodukten.)

Dithiobis-(succinimidyl)-propionate (DTSP) hat eine Molekülläge von 11 Å und reagiert nach dem gezeigten Schema (Peters, 1984) vorwiegend mit der -Aminogruppe des Lysins, in geringerem Maße mit dem Imidazolring des Histidins und der S-H Gruppe des Cysteins (Anderson et al., 1964; Cuatrecasas und Parikh, 1972; Ji, 1979) (siehe Abb. 3). Dieses Reagenz ist in Wasser schwer löslich und wird zuerst in organischem Lösungsmittel wie DMSO gelöst, um dann in die wässerige Phase transferiert zu werden.

a:



b:

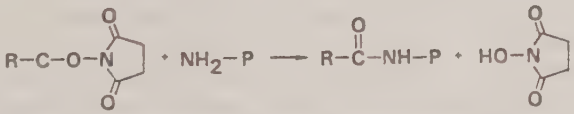


Abb. 3: a: DTSP (Dithiobis-(succinimidylpropionat))
b: Reaktionsgleichung der Vernetzung an Proteine
R: siehe Strukturformel (a)
P: Protein
Schema entnommen aus Peters (1984)

Vorteile des Reagenz:

Die Disulfidbrücken des Vernetzers können mit großer Effiziens unter milden Bedingungen mit DTT in Konzentrationen

zwischen 10 - 100 mM, pH 7 - 9, Temperaturen 25 - 37°C und Zeiten zwischen 5 - 30 min gespalten werden. Das Reagenz ist membranpermeable und erlaubt dadurch die Untersuchung von Nachbarschaftsbeziehungen sowohl innerhalb als auch außerhalb der Membran (Ji, 1983).

Nachteile des Reagenz:

a) Ein intramolekularer Disulfidaustausch zwischen Vernetzermolekülen ist plausibel. Es resultiert daraus eine mögliche Vernetzung unter nicht benachbarten Proteinmolekülen.

b) Während der Vernetzungsreaktion ist der Einsatz von reduzierenden Reagenzien (wie DTT, Mercaptoäthanol) strikt untersagt. Mobilitätsänderungen können in der eindimensionalen PAGE durch bestehende Proteindisulfidbrücken entstehen.

c) Sie können nicht in einem oxidativ-sensitiven System eingesetzt werden. Der Austausch von Disulfiden bei dem Vernetzer fordert die Präsenz von freien Sulfhydrylgruppen, die im Überschuß vorhanden sein müssen (Liu, 1977). Kinetische Studien zeigten, daß die Disulfidaustauschrate stärker proportional zu der Konzentration an (RS^-) in der deprotonierten Form ist als zu der protonierten Form (RSH) (Fava et al., 1957). Demnach kann der Austausch an Disulfidbrücken durch eine Herabsetzung des pH's auf 8.5 - 9.0, wo die Reaktion stattfindet, verhindert werden.

2.9.2.2 Methodik der Vernetzung

Folgende Vorkehrungen müssen für eine Vernetzungsreaktion getroffen werden:

1) Die Konzentration an Protein muß niedrig (1 - 2 mg/ml) gehalten werden. Damit sollte die Chance, daß sich Vernetzungsartefakte zwischen separaten Komplexen bilden, herabgesetzt werden.

2) Die meisten Reagenzien (auch DTSP) reagieren mit Lysinresten. Deshalb dürfen während der Reaktion keine Puffer mit primären oder sekundären Aminogruppen benutzt werden.

3) Der pH der Reaktionslösung ist von Bedeutung. Imidate sind pH-sensitiv und arbeiten am besten im alkalischen Milieu. Bei neutralem pH werden diese Reagenzien hydrolysiert. DTSP hat bei einem pH von 7.0 einen Halbzeitwert für seine Hydrolyse von 4 - 5 Stunden (Yutahavony et al., 1975). Um diese kompetitive Degradation zu minimalisieren, arbeitet man im alkalischen pH von 8.5 - 9.0, und das Reagenz wird portionsweise in zeitlichen Abständen hinzugefügt.

Reagenzien:

Lösung A: (25 mM) DTSP-Stammlösung
gelöst in DMSO (purum)

Die Stammlösung wurde für die Experimente auf folgende Konzentrationen verdünnt: 6.25, 2.08, 0.69, 0.23, 0.08 mM mit DMSO. Die Lösung A und die Verdünnungen wurden unmittelbar vor Reaktionsbeginn vorbereitet.

Lösung B: 20 x - (50 mM) Triäthanolamin-Puffer,
titriert mit konzentriertem HCl auf pH 9.0

Lösung C: 20 x - (8 mM) NEM-Alkylierungsreagenz
in (50 mM) Tris gelöst

Lösung D: 10 x - (2 % w/v) SDS
in Aqua bidest gelöst

Lösung E: 20 x - (2.5 mM) EDTA
in Aqua bidest gelöst

Lösung F: 500 x - (2 mM) PMSF
in Essigsäureäthylester gelöst

Die membranhaltigen Probensuspensionen (Proteingehalt: 1 - 2 mg/ml), aufgenommen in Lösung B, wurden mit Lösung F versetzt und bei 25°C im Wasserbad im Reacti-Vials-(Pearce, USA)Reaktionsgefäß gerührt. Der Vernetzer DTSP (Lösung A) wurde portionsweise (1 µl) alle 5 min hinzupipettiert, die Endkonzentration betrug 6.25 bis 0.08 mM, je nach Experiment. Die Endkonzentration an DMSO betrug 2 % (v/v). Nach 30 min wurde die Reaktion mit Zugabe von Lösung C gestoppt. Dieser Abschnitt erlaubte ein Abfangen des überschüssigen Vernetzers durch Tris, und N-Ethylmaleinimid (NEM) alkylierte und blockierte die restlichen freien SH-Gruppen, um den Disulfidbrückenaustausch zwischen Vernetzermolekülen zu verhindern. Anschließend wurden die Proben mit Lösung D vermischt und bei 60°C 30 min lang für die Isolierung des HPI-Layers inkubiert. Das Solubilisat wurde vom HPI-Layer durch Zentrifugation - 10 000 x g - 30 min bei 25°C abgetrennt. Der Überstand (Solubilisat) wurde mit Lösung E versetzt, mit einer 1 M HCl-Lösung auf pH 7.5 titriert und ohne DTT-Zugabe für die erste PAGE-Dimension aufgehoben. Das Pellet wurde erneut in Lösung D resuspendiert und einem Waschgang - 10 000 x g - 30 min lang - 25°C unterzogen. Das Pellet wurde in DTT-Anwesenheit für die PAGE vorbereitet.

Die Vernetzerkonzentrationen wurden so niedrig wie möglich gehalten, um annähernd *in situ*-Bedingungen zu gewährleisten. Strukturelle Veränderungen der Membran durch Vernetzung sollten vermieden werden.

2.9.2.2.1 Vorbereitung der zweidimensionalen PAGE

Reagenz:

Lösung A: 1.5 % (w/v) DDT in Lösung Lae-A
(1 : 4 verdünnt; siehe 2.7.1.2.1) pH 6.8

Das Solubilisat wurde nach der Vernetzung auf der ersten PAGE-Dimension (Gradient an Acrylamid: 7.5 - 12 % (w/v)) aufgetrennt. Die nicht gefärbten Gelstreifen der einzelnen Läufe wurden mit Hilfe eines Skalpells herausgeschnitten. Die Streifen wurden 10 min lang in Aqua bidest gewaschen (Badwechsel 1 x). Anschließend wurden die Streifen in Lösung A 60 min lang bei 25°C inkubiert (Badwechsel 1 x). Schließlich wurden die Streifen in der Lösung Lae-A (siehe 2.7.1.2.1) ohne DTT 90 min lang bei 25°C äquilibriert (Badwechsel 3 x). Dieser Schritt war notwendig, um den Überschuß an DTT zu entfernen. Üblicherweise wird für diese zweidimensionale Technik die DTT-Spaltung in dem Sammelgel durchgeführt. Der Nachteil ist, daß dieser Stoff in hohen Konzentrationen die Silberfärbung stört und für eine starke Hintergrundfärbung im Gel sorgt (Guevara et al., 1982). Die zweidimensionale PAGE wurde wie in 2.7.1.3 beschrieben durchgeführt. Der Acrylamidgradient betrug 7.5 - 12 % (w/v), um eine gerade Diagonale zu gewährleisten.

2.9.2.3 Prinzip der zweidimensionalen Kartierung von Vernetzungsprodukten

Die zweidimensionale Kartierung von Vernetzungsprodukten wurde zuerst von Wang und Richards (1974) in ihrer Studie über Erythrozytenmembrane eingeführt. Die erste PAGE-Dimension mit den Vernetzungsprodukten wurde mit DTT behandelt. In der zweiten PAGE-Dimension laufen die nicht reagierenden Proteinkomponenten und die nicht gespaltenen Aggregate

auf einer Diagonale (Trennung nach Molekulargewicht) (siehe Schema, Abb. 4). Vernetzungsprodukte wurden durch DTT voneinander getrennt und wanderten im Gel annähernd zu den Positionen, die den Molekulargewichten ihrer Monomere entsprachen (siehe Schema, Abb. 4, horizontale gestrichelte Linien). Demnach lieferte die erste Dimension die Größe der Vernetzungsprodukte und die zweite Dimension die Zusammensetzung, die zu dieser Größe führt. Die Identifikation beruht erstens auf der vertikalen Beziehung der Komponenten der Vernetzungsprodukte (siehe Schema, Abb. 4, vertikale gestrichelte Linie) und zweitens auf der horizontalen Beziehung der Komponenten zu den Monomeren (siehe Schema, Abb. 4, vertikale gestrichelte Linie).

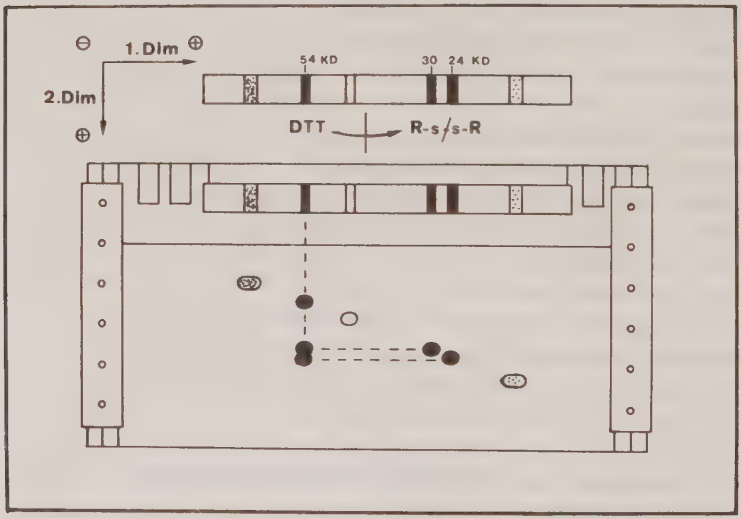


Abb. 4: Prinzip der zweidimensionalen Kartierung von Vernetzungsprodukten. Die Richtungen der PAGE von Polypeptiden in der ersten und zweiten Dimension sind durch Pfeile gekennzeichnet. Das theoretische Gel zeigt zwei Banden (30 kD und 24 kD) und das Vernetzungsprodukt 30 kD - 24 kD (= 54 kD). Diese Banden sind schwarz gezeichnet. In der erzeugten Diagonale in der 2. Dimension sind sowohl die vernetzten wie nicht vernetzten Polypeptide, getrennt nach deren apparenten Molekulargewichten, zu erkennen. Die Flecken der Monomere 30 kD und 24 kD und des Vernetzungsprodukts 54 kD sind schwarz gezeichnet. Das Schema illustriert den Begriff: vertikale und horizontale Beziehung für Vernetzungsprodukte (gestrichelte Linien).
1. Dim = erste PAGE-Dimension
2. Dim = zweite PAGE-Dimension

2.9.2.4 Interpretation und Grenze der Methode

1) Neue Banden, die nach einem Vernetzungsexperiment in der ersten PAGE-Dimension sichtbar werden, sind nicht unbedingt echte Vernetzungsprodukte. Sie können aus einer intramolekularen Vernetzung (meistens zeigen solche Produkte eine höhere Mobilität aufgrund einer kompakteren Molekülstruktur) resultieren (Ji, 1983).

2) Banden, die mit weniger Intensität in der ersten PAGE-Dimension auftreten, sind mögliche Komponenten einer Vernetzung (daher ist es von Bedeutung, die Vernetzungsversuche mit unterschiedlichen Vernetzerkonzentrationen durchzuführen). Andererseits können diese Banden durch eine Extraktion, Proteolyse oder eine geschwächte Färbung durch die Präsenz des Vernetzers entstanden sein (Ji, 1983).

3) Vernetzer wie DTSP verändern die Nettoladung eines Proteins, deshalb ist es notwendig, daß die erste PAGE-Dimension mit zwei verschiedenen Färbungsmethoden analysiert wird (Capaldi et al., 1979; Ji, 1983).

4) Ein Ausbleiben an Vernetzung für gewisse Proteine schließt nicht aus, daß diese Proteine in einer Nachbarschaftsbeziehung zueinander stehen. Ein Mangel an reaktiven Gruppen von Seiten des Reaktionspartners hindert z.B. den Vernetzer, eine Reaktion einzugehen.

5) Zusammenfassend werden folgende Auswertungskriterien herangezogen (Ji, 1979):

   a) Die Molekulargewichte der Vernetzungsprodukte und Komponenten werden aufgrund der relativen Mobilität in der PAGE ermittelt.

   b) Die eingenommene Position der Komponenten der Vernetzungsprodukte (nach Spaltung der Disulfidbrücken der

Vernetzermoleküle) in der zweiten PAGE-Dimension wird mit Banden (mit gleicher Mobilität) in der Diagonale verglichen. Dieser Schritt dient zur Identifizierung der Komponenten.

e) Die relative Bandenintensität der Vernetzungskomponenten und der Vernetzungsprodukte in der PAGE.

2.10 Elektronenmikroskopische Methoden

2.10.1 Suspensionspräparate

Standardmäßig wurden folgende Schwermetallsalze für die Negativkontrastierung verwendet:

Reagenzien:

Lösung A: 1 % (w/v) Phosphorwolframsäure (PWS) titriert mit (1 N)NAOH auf pH 6.8

Lösung B: 2 % (w/v) Ammoniummolybdat (AM) titriert mit (1 N)NAOH auf pH 6.8

Ca. 10 µl einer Präparatsuspension wurde auf ein befilmtes Netzchen (Formvar (0.5 % (w/v) in Chloroform gelöst) adsorbiert, nach 30 sec mit Filterpapier abgesaugt und auf das noch feuchte Präparat ca. 10 µl Lösung A oder B gegeben. Das Kontrastierungsmittel wurde nach 30 sec abgesaugt,und das Präparat wurde luftgetrocknet.

2.10.2 Schnittpräparate

2.10.2.1 Fixierungsmethode

2.10.2.1.1 Tannin + Glutaraldehyd/OsO_4 nach Mizuhira und Futaesaku (1972)

Diese Methode eignet sich u.a. für die Fixierung von Zellinhalt, und die nachfolgende Osmiumbehandlung zeigte außer einer Fixierung zusätzlich eine Kontrastierung der Proteine (Osmium reagiert hier nicht nur mit den Membranlipiden, sondern auch mit den ortho-Dihydroxyphenolen, d.h. den Bestandteilen des Gerbsäurederivats: Tannin (Nielson und Griffith, 1978)). Diese Fixierung wurde meistens für ganze Bakterienzellen verwendet.

Reagenzien:

Lösung A: 2 % (w/v) Tannin + 5 %(v/v) Glutaraldehyd in Lösung B gelöst

Lösung B: 50 mM Cacodylatpuffer mit konzentrierter HCL auf pH 7.0 titriert

Lösung C: 1 % (w/v) OsO_4 in Lösung B gelöst

Das zu untersuchende Material wurde einmal mit Lösung B gewaschen und bei 4000 x g 30 min lang bei 10°C zentrifugiert, anschließend wurde das Materialpellet in Lösung A aufgenommen und vier Stunden lang bei 10°C fixiert. Das Material wurde zentrifugiert und zweimal in Lösung B unter den zuletzt genannten Bedingungen gewaschen. Ein Fixierungsschritt in Lösung C, über Nacht bei 4°C, folgte. Schließlich wurde das Material dreimal unter den oben erwähnten Bedingungen gewaschen. Die Proben wurden für die Einbettung (siehe 2.10.2.2) weiterverarbeitet.

2.10.2.1.2 Glutaraldehyd/OsO_4 + Rutheniumrot nach Luft (1971); Kessel (1978)

Standardfixierungsmethoden konservieren vorzugsweise Proteine und Lipide. Polysaccharidkapseln, wie sie bei Bakterien häufig vorkommen, lassen sich mit diesen Methoden nicht darstellen. Solche Stoffe lassen sich durch eine spezielle Behandlung mit Rutheniumrot fixieren und kontrastieren (Luft, 1971; Kessel, 1978; Emde, 1980). Der Rutheniumrotkomplex $[(NH_3)_5\ Ru\text{-}O\text{-}Ru\ (NH_3)_4\text{-}O\text{-}Ru\ (NH_3)_5]^{6+}$ reagiert mit den Hydroxylgruppen der Saccharidreste der Kohlenhydratkapseln, wobei OsO_4 als Indikator dient. Durch Rutheniumrot/OsO_4 können daher nicht nur saure, sondern auch neutrale Zucker komplexiert werden. Diese Fixierung wurde hauptsächlich an ganzen Bakterienzellen, Zellwänden und Pink Envelope angewandt.

Reagenzien:

Lösung A: 50 mM Cacodylatpuffer mit konzentrierter HCl auf pH 7.0 eingestellt

Lösung B: 5 % (v/v) Glutaraldehyd in Lösung A gelöst

Lösung C: 1 % (w/v) OsO_4 + 0.5% (w/v) Rutheniumrot in Lösung A gelöst

Das zu untersuchende Material wurde einmal mit Aqua bidest und anschließend einmal mit Lösung A gewaschen und bei 4000 x g (GB) - 18 000 x g (ZW) - 48 000 x g (PE) 15 min lang jeweils bei 10°C zentrifugiert. Das Materialpellet wurde in Lösung B zur Vorfixierung vier Stunden lang bei 10°C aufgenommen und danach zweimal unter den oben genannten Bedingungen mit Lösung A gewaschen. Anschließend wurde

das Material in Lösung C über Nacht bei 25°C nachfixiert. Schließlich wurden die Proben 3 bis 5 x unter den oben erwähnten Bedingungen in Aqua bidest (bis der Überstand klar blieb) gewaschen.

NB: Phosphationen bilden mit Rutheniumrot unlösliche Niederschläge

2.10.2.2 Einbettung

Reagenzien:

Lösung A: 2 % (w/v) Agar in Aqua bidest gelöst. Die Lösung aufkochen und bei 48°C aufbewahren

Lösung B - a: 30 % (v/v) Aceton
" b: 50 % (v/v) "
" c: 70 % (v/v) "
" d: 90 % (v/v) "
" e: 100 % (v/v) " (H_2O-frei)

Lösung C - a: 1 : 3 Teile Epon + Aceton (purum)
b: 1 . 1 " " "
c: 3 : 1 " " "

Lösung C: Epon + Beschleuniger

Zur Erleichterung der Handhabung wurde das fixierte Material in Lösung A aufgenommen und bei 4°C zum Erstarren gebracht. Das Material wurde dann in größere Stücke zerteilt und entwässert, jeweils 15 min lang in Lösung B -a, b, c, d und schließlich in Lösung B - e. (Nach dem ersten Wechsel wurden die Stücke in kleinere Blöckchen getrimmt.) Danach wurde das Material jeweils 40 min lang in folgenden Lösungen

versetzt: Lösung C - a, b und c. Dann wurde es 2 x 30 min lang in Lösung D überführt, bis die Blöckchen absanken. Die einzelnen Blöckchen wurden dann auf Gelatinekapseln, die mit Lösung D gefüllt waren, verteilt. Die Polymerisation dauerte zwei bis drei Tage bei 70°C im Brutschrank.

2.10.2.3 Schneidetechnik

Die eingebetteten Materialblöckchen wurden zuerst mit Hilfe eines Reichert TM 60 getrimmt. Schnitte (60 - 90 nm Dicke) wurden mit einem Ultramikrotom LKB-Ultratom, ausgerüstet mit einem Diamantmesser (Diatome LTD - Bienne (Schweiz), angefertigt. Die auf Aqua bidest flottierten Schnitte wurden auf Formvar-beschichtete Netzchen (200 - 400 mesh) montiert.

2.10.2.4 Nachkontrastierung

2.10.2.4.1 Wässeriges Bleihydroxyd ($Pb(OH)_2$)

Reagenzien:

Lösung A: 55 % (w/v) Bleiacetat in Aqua bidest gelöst
$(CH_3(COO)_2Pb \cdot 3\ H_2O)$

Lösung B: 40 % (w/v) NaOH in Aqua bidest gelöst

25 ml Lösung A wurden gerührt und 5.3 ml Lösung B hinzugefügt. Ein Präzipitat aus $Pb\ CO_3$ bildete sich und wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde weiter verarbeitet, durch einen Millipore-Filter (0.025 µm Porengröße) filtriert und als Lösung bei 25°C aufbewahrt. Die Schnitte wurden unter einer CO_2-freien Atmosphäre auf einen $Pb(OH)_2$-

Tropfen gelegt und so 60 min lang bei 25°C kontrastiert. Um Bleicarbonatfällungen zu entfernen, wurden die mit Schnittpräparaten belegten Netzchen in CO_2-freiem (20 mM) NaOH und in CO_2-freiem Aqua bidest-Tropfen gewaschen. Die Netzchen wurden nach Absaugen des Wassers luftgetrocknet.

2.10.2.4.2 Doppelkontrastierung: Uranylacetat nach Gibbon und Grimstone (1960) + Bleicitrat nach Venable und Coggeshall (1965)

Uranylacetat

Reagenzien:

Lösung A: 5 % (w/v) Uranylacetat [$(CH_3COO)_2UO_2 \cdot H_2O$)] in 50 % (v/v) Ethanol gelöst

Die Schnittpräparate wurden auf einen Tropfen Lösung A gelegt und 60 min lang bei 25°C kontrastiert und in einem CO_2-freien Aqua bidest-Tropfen gewaschen.

Bleicitrat

Reagenzien:

Lösung B: 0.3 % (w/v) Bleicitrat in 1 N NaOH gelöst

Das bereits mit Uranylacetat kontrastierte Schnittpräparat wurde 10 min lang bei 25°C mit Lösung B kontrastiert und in einem CO_2-freien Aqua bidest gewaschen. Das Wasser wurde abgesaugt und das Netzchen luftgetrocknet.

Diese Doppelkontrastierung wurde ausschließlich an Detergens-vorbehandeltem Material verwendet, da eine Kontrastierung mit $Pb(OH)_2$ keinen ausreichenden Kontrast hergab.

2.10.3. Gefrierätzung

5 bis 10 µl einer dicken Bakterienzellsuspension wurden auf eine Objekthalterung gesetzt und in flüssigem Propan eingefroren, und unter flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Gefrierätzung wurde in einer Balzer-Gefrierätzapparatur BAF 400 durchgeführt, die mit einem Cryo-Ultramikrotom nach Moor et al. (1961) ausgestattet ist. Die Präparate wurden auf einem gekühlten Objekttisch mit einer Rasierklinge aufgebrochen, die in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mikrotomarm eingespannt war (Temperatur -180°C), bei einem Vakuum von 2.10^{-5} Pa. Anschließend wurde das Präparat bei einer Objekttischtemperatur von -105°C 2 min lang geätzt (vakuumsublimiert). Die Replikaherstellung verlief wie folgt:

Auf die frisch geätzte Oberfläche wurden 20 Å Platin/Kohle unter einem Winkel von 45° und anschließend 250 Å Kohle unter einem Winkel von 90° aufgedampft. Nach dem Auftauen der Proben wurden die Replikas auf Aqua dest abflottiert und mit Javelle-Wasser (14 % (w/v) Na-Hypochlorid: NaOCl) 120 min lang inkubiert und abschließend mit 70 % (v/v) H_2SO_4 über Nacht gereinigt. Die Replikas wurden dreimal in Aqua dest gewaschen und auf Kupfernetzchen (400 mesh) montiert. Alle Gefrierätzungen wurden am Institut für Zellbiologie der ETH Zürich (Schweiz) von Dr. I. Wildhaber durchgeführt.

2.10.4 Bedampfungstechniken

Das Aufdampfen von Schwermetallen auf biologische Oberflächen ist eine zusätzliche Kontrastierungsmöglichkeit, um Oberflächenreliefs von Strukturen abzubilden. Dazu wird auf ein Suspensionspräparat im Hochvakuum ein Metallfilm aufgedampft.

2.10.4.1 Lufttrocknung

Als Trägerfolien wurden Kohlefilme benutzt. Die so vorbereiteten Netzchen (600 mesh) wurden in einem Hochfrequenz Plasma Cleaner (Harrick) bei 10 Pa während ca. 1 - 2 min einer Glimmentladung ausgesetzt, um die Folie zu hydrophilisieren. Das Präparat als Suspension wurde auf dem Netzchen adsorbiert und in Aqua bidest gewaschen. Das überschüssige Wasser wurde abgesaugt und das Präparat luftgetrocknet. Das Netzchen wurde auf einem Präparattisch fixiert und in einer Bedampfungsapparatur mit einem Elektronenstrahlverdampfer nach Zingsheim et al. (1970) bei einem Betriebsvakuum von 1×10^{-4} Pa, einem Bedampfungswinkel von 15° - 45° mit Ta/W oder W beschattet. Die aufgedampfte Metallschicht wurde auf ca. 0.6 - 0.8 nm mit Hilfe eines Schwingquarzmonitors der Firma Balzer bestimmt. Diese Methode ist eine schnelle Methode, aber Strukturänderungen durch Oberflächenspannungen treten auf (Wildhaber, 1983; Wildhaber et al., 1985).

2.10.4.2 Gefriertrocknung

Die Präparate wurden auf die gleiche Art wie in 2.10.4.1 beschrieben hergestellt und durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff (-196°C) sofort eingefroren (Studer et al., 1981; Wildhaber et al., 1982) und auf dem magnetischen Präparattisch fixiert. Der Rezipient der Gefrierätzapparatur wurde mit trockenem N2 geflutet und der beladene Tisch unter Gegenstrom-Bedingungen auf den vorgekühlten Tischhalter (-135°C) transferiert. Bei einem Vakuum von $< 5 \times 10^{-5}$ Pa wurde das Präparat für die Trocknung auf eine Temperatur von -80°C erwärmt und das mit Stickstoff (-196°C) gekühlte Mikrotom als Kühlfalle über der Probe positioniert. Der Endpunkt der Trocknung wurde nach 60 min festfelegt. Restwasser wurde durch kurzfristigen Anstieg

der Temperatur auf -35°C 15 min lang wegsublimiert. Die Trocknung und Bedampfung verliefen in einer Balzers BAF 400-Apparatur. Die Bedampfung wurde unter einem Betriebsvakuum < 2×10^{-5} Pa bei -80°C mit Ta/W oder Pt/Kohle und einem Aufdampfwinkel von 45° durchgeführt. Diese Methode trägt zu einer besseren Erhaltung der dreidimensionalen Struktur durch eine Reduktion der Oberflächenspannung bei (Wildhaber, 1983; Wildhaber et al., 1985). Die Bedampfung der gefriergetrockneten Präparate wurde am Institut für Zellbiologie der ETH Zürich (Schweiz) von Dr. I. Wildhaber durchgeführt.

2.10.5 Methode für den Enzymnachweis und die Enzymlokalisation

2.10.5.1 5'-Nucleotidase (Nucleoside-5'-phosphomonoesterase) nach Wachstein und Meisel (1957), Nisonson et al. (1969) modifiziert

Diese Methode erlaubt einen histochemisch-elektronenmikroskopischen Nachweis dieses Enzyms und gleichzeitig seine Lokalisation. Die durch das Enzym freigesetzten Phosphate des Substrates komplexieren mit den zugeführten Bleiionen. Die Reaktionsprodukte sind feinkörnige elektronendichte Bleiphosphatniederschläge, die bei den Aufnahmen für einen hohen Kontrast sorgen.

Reagenzien:

Lösung A: 5 % (v/v) Glutaraldehyd in (50 mM) Cacodylatpuffer, pH 7.0 gelöst

Lösung B: Substrat-Medium

500 µg/ml AMP (Adenosin-5'-monophosphat, di-Natriumsalz) + 0.1 % (w/v) $Pb(NO_3)_2$ in 40 mM Tris/Maleat-Puffer, pH 7.85 gelöst

Das Material (ganze Bakterien und Pink Envelope) wurde zuerst im Substrat-Medium Lösung B aufgenommen und 30 min lang bei 30°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Probe in Lösung A über Nacht fixiert und anschließend nachfixiert, wie in 2.10.2.1.1 beschrieben (mit folgender Modifikation: Lösung A (1 % (w/v)) Tannin + 2 % (v/v)) Glutaraldehyd) 8 Stunden lang bei 25°C inkubiert. Abschließend wurde das Material in Lösung C (siehe 2.10.2.1.1) über Nacht bei 25°C inkubiert. Die Einbettung verlief wie in 2.10.2.2 beschrieben. Der Leerwert wurde ohne AMP-Zusatz behandelt.

2.10.5.2 (3'→ 5')-Exonuclease (Orthophosphoric diester phosphohydrolase)

Der Präsenznachweis dieses Enzyms beruht auf einem indirekten Weg, nämlich auf dem Nachweis der 5'-Nucleotidase. Zuerst wurde als Substrat denaturierte einsträngige DNA der (3'→ 5')-Exonuclease angeboten. Sie setzte das Substrat in phosphorylierte Nucleoside um. Diese wiederum konnten als Substrat für die 5'-Nucleotidase fungieren. Die durch die 5'-Nucleotidase freigesetzten Phosphate erlaubten den Nachweis.

Reagenzien:

Lösung A: 1.4 mg/ml denaturierte, einsträngige DNA (aus Lachssperma) in Tris/HCl-Puffer, pH 9.0, gelöst

Lösung B: Nachweis-Medium

0.66 % (w/v) $Pb(NO_3)_2$ in 170 mM Tris/Maleat-Puffer, pH 7.85, gelöst

Das Material (ganze Bakterienzellen und Pink Envelope) wurde in Lösung A 2 Stunden lang bei 30°C inkubiert. Es wurde dann mit Lösung B 30 min lang bei 30°C versetzt. Nach diesem Inkubationsschritt wurden alle nachfolgenden Schritte, wie in 2.10.5.1 beschrieben, durchgeführt. Der Leerwert wurde mit einer Behandlung der Probe ohne DNA-Zugabe bestimmt.

2.10.6 Mikroskopie

Die Präparate wurden in einem Philips-Transmissions-Elektronenmikroskop EM 400 T bei 80 kV Beschleunigungsspannung untersucht. Agfa-Gevaert Scienta 23 D 56 P 3 AH Filmmaterial wurde für die Aufnahmen benutzt.

2.11 Sonstige Methoden

2.11.1 Infrarotspektroskopie

2.11.1.1 Begründungen und Ziel der Untersuchungen

Die IR-Spektroskopie dient normalerweise zur Identifizierung bestimmter Gruppen in Molekülen, zur Untersuchung von Wechselwirkung und Assoziation zwischen Molekülen oder Molekülbereichen und letztlich auch zur Konformationsuntersuchung an Proteinen (Seredynski, 1979; Kleffel, 1980; Kleffel et al., 1985). Diese Methode trug zu wichtigen Strukturaufklärungen an biologischen Membransystemen bei (Fringeli et al., 1981). Sie wurde auch gezielt an äußeren und cytoplasmatischen Membranen von Bakterien eingesetzt (Nakamura et al., 1974). Die Infrarotmessungen wurden in dieser Arbeit durchgeführt, um zusätzliche Informationen über die Stoffzusammensetzung der verschiedenen Extrakte

sowie den Einfluß der unterschiedlichen Präparationsmethoden auf den Zustand des HPI-Layers und der Pink Envelope-Proteine zu erhalten. Die charakteristischen Infrarotbanden von Proteinen, Lipiden und Zuckern sind in Tafel 6 dargestellt.

2.11.1.2 Grundlage der Meßmethode

2.11.1.2.1 ATR-Technik

Die Spektren wurden mit Hilfe der ATR-Technik ("attenuated total reflection") mit einem Infrarot-Spektrophotometer 325 der Firma Perkin-Elmer aufgenommen. Diese Meßtechnik beruht auf dem Phänomen der vielfachen Totalreflexion des Meßstrahls innerhalb einer planparallelen Platte aus einkristalligem Material von hohem Brechungsindex (hier mit Germanium) (Harrick, 1967). Dabei dringt der Meßstrahl bei jeder Reflektion etwas in die Probe ein.

2.11.1.2.2 Meßbereich

Die Messungen beschränkten sich auf den Bereich λ = 4000 cm^{-1} bis 1000 cm^{-1}. Dieses Intervall entspricht der Durchlässigkeit der Germaniumplatte.

2.11.1.2.3 Auftragung der Probe

Die Platte wurde vor der Messung sorgfältig mit Äthanol, letztlich mit Aqua bidest. gereinigt und mit flusenfreiem Papier abgewischt. Eine weitere Reinigung vollzog sich in einem Plasma-Cleaner durch eine Gasentladung bei 10 Pa. Das zu untersuchende Material wurde gleichmäßig auf die mittlere Fläche der Platte aufgetragen (30 - 50 µg Proteine). Die Probe wurde luftgetrocknet und gemessen.

2.11.1.2.4 Quantitative Ermittlung des Lipidgehaltes in einem Lipid-Protein-Gemisch nach Karrenberg (1981)

Die Lipid-Protein-Eichkurve (Tafel 7) beruht auf Messungen von Lipid-Protein-Gemisch (Cardiolipin - Myoglobin). Das Amplitudenverhältnis zwischen der Amplitude der Estercarbonylstreckschwingungsbande bei λ = 1740 cm^{-1} (A(1740 cm^{-1})) und der Summe dieser Amplitude mit der Amid I-Bande bei λ = 1653 cm^{-1} (A(1653 cm^{-1})) wurde gegen den Prozentanteil an Proteinen in der Mischung aufgetragen. Die im Text (siehe 3.1.3.5) angegebenen Lipid-Werte wurden stets als Verhältnis von Lipid zu Protein in Prozent angegeben.

2.11.2 Aminosäuren-Analyse

Die proteinhaltigen Proben wurden mit 6 N HCl, 0.1 % (v/v) Thioglykolsäure über 20 Stunden bei 110°C standardmäßig hydrolysiert. Die Aminosäuren-Analyse wurde auf einem Aminosäuren-Analysator LC 6001 der Firma Biotronik im Einsäulenverfahren mit einem Trennungsprogramm, außerdem fähig, Hexosamine aufzutrennen (Biotronik, 1981), durchgeführt. Die Hydrolyse für die Tryptophanbestimmung wurde nach Zusatz von 4 % (v/v) Thioglykolsäure zur 6 N Salzsäure durchgeführt. Die Analysen wurden in der Abteilung für Proteinchemie (Leiter: Priv.-Doz. Dr. G. Steffens) von Grünenthal GmbH (Aachen-Eilendorf) durchgeführt.

2.11.3 Hydrophobizitätsberechnung von Proteinen anhand von Aminosäuren-Analyse nach Barrentes (1975)

Die Aminosäuren-Zusammensetzung eines Proteins in Form einer Analyse enthält Informationen über ihre gesamte Ladung bzw. die Balance zwischen den hydrophilen und hydro-

phoben Anteilen. Dieses Verhältnis spielt eine große Rolle bei Membranproteinen. Einige Versuche wurden gestartet, um empirische Kriterien herauszuarbeiten. Der gemittelte Hydrophobizitätswert $\bar{H}\Phi$ ave wurde als Parameter zuerst durch Bigelow (1967) eingeführt. $\bar{H}\Phi$ ave basiert auf den freien Energiewerten. Sie werden bei dem Transfer einer Aminosäure aus einem organischen Solvent zu einem wässerigen Milieu (Tanford, 1962) (siehe Tabelle 2) erzielt. Dieser Parameter allein genügte nicht, um einen Charakterunterschied (peripher oder intrinsisch) zwischen einzelnen Proteinen herauszuarbeiten (Cantor und Schimmel, 1980). Barrantes (1975) wählte die Kombination von objektiven Parametern wie die Ratio 3 (R_3) und $\bar{H}\Phi$ ave unter Benutzung statistischer Methoden aus. Die Einführung von Diskriminierungsfunktionen als lineare Funktion erlaubte den Unterschied zwischen peripheren Membranproteinen, die einen geringeren Anteil an hydrophoben Aminosäuren besitzen, und intrinsischen Proteinen mit einem größeren hydrophoben Anteil zu verdeutlichen. Die Funktion lautet wie folgt:

$$Z = -0.345 \cdot R_3 + 0.6 \cdot \bar{H}\Phi \text{ ave}$$

wobei

$$R_3 = \text{Ratio}_3 = \frac{\text{Lys + Arg + His + Asx + Glx}}{\text{Ile + Tryp + Phe + Leu + Val + Met}} = \frac{\Sigma\, k \cdot X\, k}{\Sigma\, j \cdot X\, j}$$

mit k = polare AS-Seitenketten
j = apolare AS-Seitenketten
X = die Frequenz des Auftretens von Seitenketten

und $\bar{H}\Phi$ ave ist die totale Hydrophobizität, dividiert durch die Anzahl an AS nach Bigelow (1967).

$$\bar{H}\Phi \text{ ave} = \sum_i \Delta ft_i \cdot Xi/i$$

und Δft_i = freie Übergangsenergie einer Aminosäure = "free energy of transfer" nach Tanford (1962)

für alle Aminosäuren außer Tryptophan. Die Werte für Δft_i wurden der folgenden Tabelle entnommen, wobei die Werte für Ser, His, Asp, Glu nicht berechnet worden sind und nicht in die Berechnung eingehen.

AMINOSÄURE	$\bar{H}\Phi$ (kcal/res.)	AMINOSÄURE	$\bar{H}\Phi$ (kcal/res.)
Trp	3.00	Cys/2	1.00
Ile	2.95	Ala	0.75
Tyr	2.85	Arg	0.75
Phe	2.65	Thr	0.45
Pro	2.60	Gly	-
Leu	2.40	Ser	-
Val	1.70	His	-
Lys	1.50	Asp	-
Met	1.30	Glu	-
		Amid	-

Tab. 2: Hydrophobizitätsberechnung der einzelnen Aminosäurenseitenkette (wurde aus Bigelow (1967) entnommen).

Die Z-Werte erlauben keine exakte Aussage über die endgültige Lokalisation eines Membranproteins. Aber sie zeigen deutlich den Hydrophobizitätsunterschied zwischen Membranproteinen.

2.11.4 Dichte-Bestimmung mit Percoll

Reagenzien:

Lösung A: (2.5 M) Saccharose in Aqua bidest gelöst

Lösung B: Isoosmotische Percoll-Lösung

9 ml Percoll (purum) + 1 ml Lösung A

Marker-Beads (Pharmacia) von unterschiedlicher Dichte: 1.02 bis 1.14 g/ml

Die zu untersuchende Probe (Pink Envelope-Suspension) wurde mit den Marker-Beads in Lösung B aufgenommen und vermischt. Der Gradient formiert sich *in situ* durch Zentrifugation bei 48 000 x g 45 min lang bei 10°C. Die unbekannten Dichten wurden anhand einer aufgestellten Eichkurve (Dichte (g/ml) gegen Bandenposition im Gradienten (cm)) ermittelt.

2.11.5 Entfernung von Detergens aus Proteinlösungen

2.11.5.1 Isoamylalkohol-Extraktionsmethode nach Mather und Tamplin (1979), Salcedo et al. (1983)

Reagenzien:

Lösung A: Isoamylalkohol (Isopentanol)

1 Teil Probe wurde mit 5 Teilen Lösung A versetzt, bei 5°C vermischt und bei 2000 x g 10 min lang bei 5°C zentrifugiert. Eine Phasentrennung bildete sich, die obere organische Phase mit dem darin gelösten Detergens wurde von der unteren wässerigen Phase abgetrennt. Die Extraktion wurde im Mikromaßstab durchgeführt.

2.11.5.2 Bio-Beads SM 2-Extraktionsmethode nach Horigome und Sugano (1983)

Reagenzien:

Bio-Beads SM2 (20 - 50 mesh) von Bio-Rad

Lösung A: Methanol

Lösung B: 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.8 mit 0.05 % (w/v) Na-azid

Das Gelmaterial wurde zuerst in Lösung A 15 min lang bei 25°C inkubiert (3 g in 20 ml Lösung A), anschließend auf eine Glasfritte zurückgewonnen, zweimal mit 150 ml Aqua bidest gewaschen und letztlich in Lösung B bei 5°C aufbewahrt. Am Boden eines Eppendorfhütchens wurde ein Loch mit Hilfe einer Injektionsnadel gebohrt und mit etwas Glaswolle gefüllt. 0.5 ml bis 1.0 ml Bio-Beads wurden hinzupipettiert und bei 200 x g 2 min lang bei 25°C zentrifugiert. Die Probe (0.150 - 0.3 ml) mit einer Detergenskonzentration $\leq$ 2 % wurde auf das Gelmaterial pipettiert und zur Absorption 5 min lang bei 25°C stehengelassen, um schließlich durch Zentrifugation bei 400 x g 1 min lang bei 25°C zurückgewonnen zu werden.

2.12 Proteinase-Behandlung des nicht dissoziierten HPI-Layers

Reagenzien:

Lösung A: HPI-Layer-Suspension (8 mg/ml) in 25 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.8

Lösung B: Proteinase-Lösung in 25 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.8

Lösung B_1: Proteinase von R_1 (PEp P) der Reinigungsstufe (1) (Emde, 1985) (10 µl Ansatz)

Lösung B_2: Kommerzielle Proteinasen (5 µl Ansatz) α-Chymotrypsin (EC 3.4.21.1); B_3: Trypsin (EC 3.4.21.4); B_4: Pronase E, Typ XIV (aus *Streptomyces griseus*); B_5: Pronase K, Typ XI (aus *Tritirachium album*); B_6: V8, Proteinase (aus *Staphylococcus aureus*); B_7: Subtilisin-Carlsberg, Typ VIII; B_8: Thermolysin, Typ X; B_9: Papain.

Der HPI-Layer (200 µl/Ansatz) wurde jeweils mit 1 ml einer Lösung B_{1-9} versetzt und 30 min lang bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Die begrenzte Proteolyse wurde mit Inhibitorzusatz gehemmt (Proteinasen der Lösung B_1 bis B_6 und B_9 mit 2 mM PMSF; Lösung B_7 mit 5 mM EDTA; Lösung B_8 mit 1 mM p. HMPS (p. Hydroxymercuriphenylsulfonsäure . Na-Salz). Anschließend wurde der Layer bei 10 000 x g 30 min lang bei 5°C pelletiert und für die PAGE vorbereitet.

2.13 Herkunft der Chemikalien

Fa. Merck, Darmstadt	Alle üblichen Chemikalien, Reinheitsgrad p.A.
Fa. Sigma, München:	Tris, alle benutzten Proteinasen und sonstigen Enzyme, Proteinase-Inhibitoren, Eichsubstanzen für diverse Analysen
Fa. Serva, Heidelberg:	SDS - Sulfobetain (SB_{12}), LiDs, Triton X-100, Elektrophorese-Chemikalien, Glutaraldehyd, Einbettungschemikalien, DTSP
Fa. Fluka, Eschborn:	LDAO, Triton X-114, Rutheniumrot
Fa. Bio-Rad, München:	PAGE-Marker, Bio-Beads SM-2
Fa. Oxyl, Bobingen:	MEGA-10
Fa. Heraeus, Köln:	Osmiumtetroxyd
Fa. Pharmacia,Freiburg:	Percoll, Density-Marker-Beads
Fa. Miles, München:	V8-Proteinase

3. Ergebnisse

3.1 Katalog der Pink Envelope-Proteine (R_1, Sark)

3.1.1 Morphologie der Zellwände von ganzen Bakterien

Der vielschichtige Aufbau der Bakterienzellwand, der in der Einleitung beschrieben wurde (siehe 1.2), ist in der Tafel 8 (Abb. B) deutlich erkennbar. Beide Bakterienstämme (R_1 und Sark) zeigen die gleiche Grundstruktur. R_1 besitzt ein kompakteres Intercalating-Material (IM) und eine dickere Kohlenhydratkapsel (CL), erkennbar an dem stärker kontrastierten Material in den Dünnschnitten. Die Gefrierätzung (Tafel 9) gibt einen Oberflächenabdruck der Zellen wieder. R_1 (Abb. A) hat auf seiner Oberfläche fadenartige Strukturen. Die Saccharidketten der Kohlenhydratkapsel kollabieren durch die Dehydratisierung während der Gefrierätzung und erzeugen diese unregelmäßigen Oberflächen. Die dünnere Kohlenhydratkapsel von Sark (Abb. B) erscheint nur als glatte Schicht, durch die das hexagonale Muster des HPI-Layers (SES) durchscheint. Die Sark-Mutante (CL^-) (siehe Abb. C in Tafel 8) hat ein sehr aufgelockertes Intercalating-Material (IM) und vor allem keine Kohlenhydratkapsel. Die Gefrierätzung (Abb. C) verdeutlicht deren Abwesenheit, der HPI-Layer (SES) ist an der Oberfläche nackt und Feinstrukturen wie Core, Poren und Rosetten werden sichtbar. Die Sark-Mutante (HPI^-) besitzt ebenfalls ein aufgelockertes Intercalating-Material (IM). Der HPI-Layer fehlt (Abb. D), und die äußere Membran schließt die Zellwand ab. Die Oberfläche der äußeren Membran (Abb. D) ist amorph und zeigt wulstförmige Erhebungen. (Diese Oberflächenbeschreibung trifft auch für *Deinococcus radioproteolyticus* zu (Emde, 1980).) Der Gefrierbruch findet an spaltbaren Strukturen, im allgemeinen in dem hydrophoben Innern des Lipid-Bilayers statt (Verkleij und Ververgaert, 1978; Sleytr und Glauert, 1982). Bei den untersuchten Objekten sind solche Brüche ausschließ-

lich an der cytoplasmatischen Membran (Cm_{EF}) mit ihrer typischen rauhen Struktur erkennbar. Gelegentlich bricht die Zelle im Bereich des Cytoplasmas (CP_F) (Abb. C). Ein Gefrierbruch entlang der äußeren Membran (Om) war nicht zu beobachten. Nur gelegentlich wurden Gefrierbrüche der äußeren Membran an *Deinococcus radiodurans* beobachtet (Sleytr und Glauert, 1982). Generell sind Brüche der äußeren Membran seltener als bei der cytoplasmatischen Membran (Sleytr et al.,1979).

3.1.2 Proteolyse: *in vivo* oder *in vitro*?

Vor Beginn dieser Arbeit bestand die Auffassung, daß eine der Hauptkomponenten der Zellwand, nämlich das HPI-Layer-Protein (PEp B) bereits *in vivo* proteolysiert wird (Baumeister et al., 1982; Rachel, 1982; Rachel et al., 1983). Die Proteolyse sollte schon während der exponentiellen Wachstumsphase der Kulturen stattfinden (Rachel, 1982). Andererseits zeigten die Autoren, daß das Sark-HPI-Layer-Protein in Anwesenheit von Proteinase-Inhibitoren mit einem geringeren Proteolysegrad isolierbar war. Diese Punkte und die Befürchtung, daß der Abbau nicht auf den HPI-Layer beschränkt ist, machten eine genauere Untersuchung der Proteolyse erforderlich. Die Proteolyse sollte anhand des bekannten Urpolypeptids (PEp B) des HPI-Layer-Proteins im Verlauf des Bakterienwachstums mit Hilfe der SDS-PAGE verfolgt werden.

3.1.2.1 Proteolyse des HPI-Layer-Proteins in Abhängigkeit vom Wachstum

Die Wachstumsbedingungen für dieses Experiment sind in 2.3.2 nachzulesen. Die ganzen Bakterien wurden nach ihrer Ernte im auf 100°C vorerhitzten Probenpuffer ohne Inhibitorzusatz (siehe 2.7.1.2.4) injiziert und 20 min lang bei der gleichen Temperatur inkubiert. Eine proteolytische Aktivität

während der SDS-Inkubation läßt sich nicht definitiv ausschließen (Temperaturgradient am Anfang der Inkubation zwischen den Bakterien, die vorher bei T.ca.0°C aufbewahrt wurden, und der kochenden SDS-Lösung, aber zumindest stark verringern (Pringle, 1975). Das von nichtlöslichen Bestandteilen befreite Solubilisat wurde elektrophoretisch untersucht. Die Tafeln 10 und 11 zeigen die Ergebnisse jeweils für R_1 und Sark. Die "Zell-gebundene" spezifische Proteinaseaktivität, gemessen mit ganzen Zellen, zeigt bei R_1 (Tafel 10, Abb. A) einen Anstieg bis 430 µg Protein nach 18 Stunden in der logarithmischen Wachstumsphase. Diesem Optimum folgt ein Abfall der Aktivität bis zu einem Wert von 125 µg in der stationären Wachstumsphase (während dessen steigt die spezifische Aktivität der freigesetzten Proteinase in der Nährlösung (Emde, 1985)). Sark zeigt einen regelmäßigen Verlauf der "Zell-gebundenen" spezifischen Proteinaseaktivität, ohne ein akzentuiertes Maximum zu durchlaufen (siehe Tafel 11, Abb. A). Die Werte bewegen sich zwischen 40 und 56 U/mg-Protein während des Wachstums. Das Elektropherogramm für den Stamm R_1 zeigt, daß das Polypeptid PEp B des HPI-Layer-Proteins (Tafel 10, Abb. C) vorhanden ist und daß die Bande nicht an Färbungsintensität während des Wachstums abnimmt. Das prominente Spaltfragment PEp B pf 1 (R_1) nimmt während der Wachstumsperiode nicht zu. Das gleiche Ergebnis trifft für den Stamm Sark zu (Tafel 11, Abb. C). Das Polypeptid PEp B (Sark) liegt in einem fast nicht proteolysierten Zustand vor. Eine kausale Verknüpfung zwischen Wachstum und dem Proteolysegrad des präparierten HPI-Layer-Proteins läßt sich für beide Stämme nicht herstellen. Das Experiment zeigt deutlich, daß eine *"in vivo"* Proteolyse, ausgedrückt durch eine Abnahme des Polypeptids PEp B, zugunsten einer Zunahme seiner proteolytischen Spaltfragmente wie PEp B pf 1 für beide Stämme nicht eintritt. Man beachte weiterhin, daß sich das komplizierte Bandenmuster der solubilisierten

Bakterienzellen über den Wachstumsverlauf als außerordentlich stabil erweist. Das Ergebnis macht eine Proteolyse *in vitro* wahrscheinlich. Andere Versuche erhärten diese Schlußfolgerung (siehe 3.1.2.3, 2.1.3.6.3.2).

3.1.2.2 Messung der Wirksamkeit von Proteinase-Inhibitoren an ganzen Zellen (GB)

Dieser Versuch dient der Erfassung der Effizienz von Proteinase-Inhibitoren an ganzen Bakterienzellen zur Optimierung der Präparation. Inhibitoren der folgenden Proteinase-Klassen wurden eingesetzt (North, 1982; Barrett, 1977):

1) Inhibitoren der Serinproteinasen: PMSF, Leupeptin, Chymostatin, Antipain, Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (SBTI), Aprotenin.
2) Inhibitoren der Thiolproteinasen: p-Hydroxymercuribenzoat (HMB), p-Hydroxymercuriphenylsulfonat (HMPS), Mersalylsäure-Na-Salz (MSL-Na), Jodacetamid, Dithiopyridin (DTP), Dithiotreitol (DTT).
3) Inhibitoren der Metallo-Proteinasen: EDTA, EGTA, DTT, zweiwertige Ionen, 1.10-Phenanthroline (PATL), Phosphoramidon (PPAD).

Die Tafel 12 mit den Abb. A, B, C, D enthält nur die Resultate, in denen eine Hemmung erzielt wurde. Eine der wirkungsvollsten Inhibierungen ist mit zweiwertigen Ionen wie Cu^{++} (Abb. A) erreicht worden. Eine Konzentrationsreihe (Abb. B) mit diesen Ionen zeigt, daß die Inhibierung unspezifisch ist. Eine nahezu vollständige Hemmung der Proteinaseaktivität ergibt sich nur bei einer Konzentration des Inhibitors (größer als 1 mM) ab 10 mM. Der zweiwertige Chelatbildner EDTA dagegen liefert eine Inhibierung von 69 % (R_1) bzw. 83 % (Sark) bei einer Konzentration ab 1 mM (Abb. C).

Kupferionen, EDTA und PMSF sind wirkungsvolle Inhibitoren der Proteinase von R_1 und Sark und kommen in Betracht, um für präparative Zwecke eingesetzt zu werden. Die Proteinase-Aktivität wurde mit der Azocasein-Bestimmung ermittelt (siehe 2.6.1).

NV: Die Kupferbindung kann ausgenutzt werden, um die sezernierte Proteinase aus dem Kulturmedium mit Hilfe eines Affinitätsgels spezifisch zu isolieren. Die Proteinase kann vom gebundenen Kupfer befreit und reaktiviert werden (Emde, 1985).

3.1.2.3 Effektivität von zwei Inhibitoren (Cu^{++}/PMSF), getestet an der Präparation des HPI-Layers

Die Elektropherogramme in Tafel 13, Abb. C und E zeigen die unterschiedlichen Spaltfragmente, die durch die begrenzte Proteolyse während einer Inhibitor-freien Präparation auftreten (siehe auch Tafel 3 (Präparationsschema) und 2.4.1) (Karrenberg, 1981, Karrenberg et al., 1982; Rachel, 1982) (siehe Tabelle 3). Kupferionen komplexieren mit den Detergentien SDS und LiDS und verursachen Ausfällungen. Die Beobachtung, daß die Inhibierung der Proteinase auch nach dem Waschen der Bakterien erhalten blieb, machte eine Umgehung dieses Problems möglich. Die Bakterien wurden wie in 2.4.1.1.2 beschrieben in einer Kupferfreien Detergenslösung zur Freisetzung des Layers inkubiert. Die Präparationen mit Kupferionen und PMSF brachten die gleichen Resultate, die Tafel 13 liefert einen Überblick über die Ergebnisse. Es gelang nicht, die Proteolyse bei dem Stamm R_1 nennenswert zu unterdrücken. PEp B nimmt jedoch an Intensität gegenüber dem proteolytischen Bandenmuster zu, das mit Präparation ohne Inhibitor erzielt wird. Weiterhin treten folgende Spaltfragmente in Anwesenheit von Inhibitoren schwächer auf: pf 2, 6, 7, 9 und pf 13 (Tafel 13,

Abb. D). Bei dem Stamm Sark stellt sich ein anderes Bild dar. Alle proteolytischen Fragmente (Tafel 13, Abb. E) verschwinden bis auf pf 1, 5, 6, 7, und pf 11, die nur schwach auftreten. PEp B, das "Urpolypeptid", kann nahezu proteolysefrei elektrophoretisch dargestellt werden (Abb. F). Die Abb. G zeigt zusätzlich am Beispiel des HPI-Layers (Sark)den Effekt der Inkubationsdauer in kochender SDS-Lösung. Die vollständige Dissoziation des Layers wird ab ca. 5 min Inkubationszeit erreicht.

Name des Polypeptids	proteolytisches Fragment (pf)	Stamm R_1 MG app (kD)	Stamm Sark MG app (kD)
PEp B	-	104	108
"	pf 1	91	98
"	" 2	84	91
"	" 3	70	87
"	" 4	65	84
"	" 5	58	75
"	" 6	53	72
"	" 7	50	64
"	" 8	40	56
"	" 9	34	48
"	" 10	30	38
"	" 11	21	34
"	" 12	18	32
"	" 13	15	29
"	" 14	13	15
"	" 15	-	13

Tabelle 3: Katalog der proteolytischen Fragmente der beiden HPI-Layer-Polypeptide (PEp B) von R_1 und Sark mit ihren zugehörigen apparenten Molekulargewichten (PEp B: siehe Nomenklatur 3.1.3.6; Elektropherogramme siehe Tafel 10 und 11, Abb B, Tafel 13, Abb. C bis H).
MG app = apparentes Molekulargewicht

Die Ergebnisse, die mit PMSF für die beiden Stämme erzielt wurden, sind im Einklang mit den Resultaten von Rachel (1982). Die Kontamination mit dem Polypeptid PEp A (120 kD) bei der Präparation des HPI-Layers (Sark) mit PMSF/LiDS, 4°C, war hier jedoch nicht zu beobachten.

Die vorliegenden Experimente zeigen, daß der HPI-Layer (R_1) eine Restproteolyse, unabhängig von der Präparationstemperatur und den benutzten Inhibitoren, beibehält. Im Gegensatz dazu kann der HPI-Layer (Sark) unabhängig von der Präparationstemperatur und mit den beiden Inhibitoren quasi proteolysefrei gewonnen werden.

Diese Resultate zeigen, daß die Proteolyse mit großer Wahrscheinlichkeit *in vitro* stattfindet und mit unterschiedlichem Erfolg bei beiden Stämmen während der Präparation zu beeinflussen ist. Der Stamm Sark stellt sich als der bessere Kandidat für nahezu proteolysefreie Präparationen dar.

3.1.3 Die Pink Envelope (PE): Vergleich zwischen R_1 und Sark

3.1.3.1 Trennung von Pink Envelope und cytoplasmatischer Membran

3.1.3.1.1 Morphologischer Nachweis

Die Kontamination von Pink Envelope-Präparationen mit cytoplasmatischen Membranen (Cm) läßt sich am deutlichsten im Elektronenmikroskop beobachten. Die Tafel 14 mit den Abbildungen A und B zeigt Zellwandausschnitte, in denen vesikulierte Cm-Fragmente noch mit dem Murein verankert sind. Diese Kontamination kann auf zwei Wegen beseitigt werden: erstens unter Benutzung der unterschiedlichen Dichten, der Cm und der Om durch Trennungsmittel der Saccharose-Dichte

Gradienten-Zentrifugation (Osborn et al., 1972); und zweitens durch spezifische Solubilisierung der Cm mit dem Detergens Triton X-100. Diese Methode wurde mehrfach für Zellwandpräparationen wie z.B. bei *Escherichia coli* (Schnaitman, 1971; MacGregor et al., 1979), bei *Sulfolobus acidocaldarius* (Weis, 1974) und bei *Clostridium thermohydrosulfuricum* (Sleytr und Glauert, 1976) angewandt. Diese Triton X-100-Methode wurde hier mit Erfolg auf *Deinococcus radiodurans* übertragen (2.4.2). Die Dichtegradienten-Zentrifugation lieferte keine Auftrennung, da die Cm-Reste durch Adhäsion mit der Zellwand verknüpft blieben.

Die Detergensextraktion wirkt in erster Linie spezifisch auf die Cm. Die Om behält die für Membranen charakteristische Doppellinie in kontrastierten Dünnschnitten. Eine zusätzliche morphologische Veränderung ist die starke Zurückbildung der Kohlenhydratkapsel (CL) (gut sichtbar an den Zellwänden von R_1, Tafel 15, Abb. A). Die Pink Envelope ist von Cm-Vesikeln und zusätzlich von Om-Vesikeln befreit (Tafel 15, Abb. C bis H). Dies ist nicht nur allein auf die Solubilisierung durch Triton zurückzuführen (siehe 3.1.3.2). Die Pink Envelope-Präparation nach Triton-Behandlung ist sehr einheitlich im Vergleich mit der verunreinigten (Tafel 14, Abb. G und H; Tafel 15, Abb. G und H). Man beachte, daß die Pink Envelope nach Triton-Behandlung die bakterielle Form weitgehend behält. Das intakte morphologische Bild der gereinigten Pink Envelope täuscht insofern, als ein Teil der Lipopolysaccharide und Lipide u.a. durch Triton X-100 entfernt werden (siehe 3.1.3.3; 3.1.3.5). Trotzdem bleibt die Doppellinie der Om sichtbar. Möglicherweise sind die Wechselwirkungen der Pink Envelope-Proteine mit Murein stärker als die in den Cm-Proteinen, wodurch das Zellwandsystem trotz der teilweisen Delipidierung der Om (siehe 3.1.3.5) morphologisch intakt bleibt. Triton X-100 kann teilweise die Positionen der Phospholipide in der Om einnehmen und dadurch die Doppelmembranstruktur erhalten (Schnaitman, 1971).

3.1.3.1.2 Enzymatischer Nachweis

Ein komplementärer und empfindlicher Nachweis,um die Reinigung der Pink Envelope von Cm-Kontamination zu quantifizieren, liefert die enzymatische Aktivität der beiden Leitenzyme (SDH und LDH) der cytoplasmatischen Membran (siehe 2.6.2). Die Tabelle 4 faßt die Ergebnisse der Triton-Behandlung von Zellwänden bis zur Pink Envelope zusammen.

Die Aktivität der beiden Enzyme befindet sich ausschließlich in dem Triton-Solubilisat (Freisetzung des Enzyms). Eine membrangebundene Restaktivität an der Zellwand bzw. Pink envelope nach der Detergensbehandlung ist nicht mehr vorhanden. Das Ergebnis ist im Einklang mit dem elektronenmikroskopischen Befund von 3.1.3.1.1.

	Stamm R_1				Stamm Sark			
Präparationsschritte	Zw	Triton-solubilisat aus Zw	Zw nach Triton	PE	Zw	Triton-Solubilisat aus Zw	Zw nach Triton	PE
spezifische Aktivität	mU/mg Protein				mU/mg Protein			
SDH	92	442	0	0	30	136	0	0
LDH	28	325	0	0	10	217	0	0

Tabelle 4: Reinigung der Pink Envelope, von Cm verfolgt anhand von zwei Cm-Leitenzymen (SDH und LDH).
Zw = Zellwände; PE = Pink Envelope
Cm = cytoplasmatische Membran
SDH = Succinat Dehydrogenase
LDH = Lactat Dehydrogenase

3.1.3.1.3 Elektrophoretische Untersuchung nach Solubilisierung mit Triton X-100

Das Bandenmuster des Tritonsolubilisats (Tafel 16, Abb. C2) beinhaltet einige Polypeptide (siehe Tabelle 5), die in dem Elektropherogramm der Zellwand sichtbar, aber nach der Detergensbehandlung quantitativ entfernt sind. Diese Polypeptide müssen folglich der Cm zugesprochen werden. Das Elektropherogramm deutet auf eine gleichzeitige Anwesenheit von einigen Hauptpolypeptiden der Pink Envelope, wie PEp A, C und PEp D hin. PEp B dagegen wurde nicht solubilisiert. Dies bedeutet, daß Pink Envelope-Fragmente (bzw. Om-Vesikel) durch Triton solubilisiert wurden. Diese Beobachtung ist mit der Erklärung im morphologischen Teil 3.1.3.1.1 im Einklang.

Polypeptidbezeichnung	Stamm Sark (CL^-)	Stamm Sark	Stamm R_1
	MG app (kD)		
Cmp 1	86	86	86
Cmp 2	25	25	25
Cmp 3	15	-	20
Cmp 4	13	13	-

Tabelle 5: Zuordnung der Polypeptide der cytoplasmatischen Membran (Cmp) bei den Stämmen R_1, Sark (PAGE, siehe Tafel 16, Abb. C) und Sark (CL^-).
Cm = cytoplasmatische Membran; MG app = apparentes Molekulargewicht

3.1.3.2 Aktivität der Om-gebundenen Proteinase in verschiedenen Pink Envelope-Präparationen

Die Aktivität der Om-gebundenen Proteinase wurde mit dem Azocaseintest (2.6.1) bei verschiedenen Pink Envelope-Prä-

parationen verfolgt. Die Tabelle 6 faßt die Ergebnisse zusammen. Bei den vier untersuchten Objekten zeigt der Stamm R_1 die höchste Aktivität in ganzen Zellen. Sie ist im Durchschnitt um den Faktor 4.6 höher als bei Sark. Die spontanen Labormutanten Sark (CL^-) und (HPI^-) zeigen die niedrigsten Werte. Die Hemmung der Proteinase, gemessen nach Zugabe des Inhibitors PMSF (mit einer Endkonzentration von 5mM bei 5°C),ist annähernd gleich bei R_1 und Sark (80 % Inhibierung bei R_1; 84 % Inhibierung bei Sark). Erst nach dem Zellaufschluß bis zur Präparation der Pink Envelope ist eine nahezu vollkommene Inhibierung ausschließlich bei Sark erreichbar. Dagegen behält R_1 eine membrangebundene Restaktivität von 22 % bei den Zellwänden, dieser Wert läßt sich bis auf restliche 2 % bei der Pink Envelope minimalisieren. Das Tritonsolubilisat weist bei allen Präparationen Aktivität auf. Dies zeigt, daß die Detergensbehandlung zusätzlich zu einer Proteinasereinigung der Zellwand beiträgt (indem z.B. geschädigte und vesikulierte Om-Fragmente solubilisiert werden (siehe 3.1.3.1.1)).

Aufgrund der Vermutung, daß beide Stämme, R_1 und Sark, über die gleiche Proteinase in der Om verfügen (Emde, 1985), ist es in erster Näherung unverständlich, warum die Pink Envelope von R_1 eine Restaktivität beibehält. Eine eindeutige Erklärung für diese Tatsache läßt sich schwer finden. Erwähnenswert ist, daß die Wirkung der Inhibitoren gegenüber der membrangebundenen und der gereinigten Proteinase Unterschiede bezüglich Konzentration und Inhibierungsgrad aufweist. Möglicherweise sind sterische Gründe für den Zugang des Inhibitors zu der Proteinase verantwortlich, je nachdem, ob sie frei in Lösung oder membrangebunden vorliegt (siehe Emde, 1985).

Die übrigen Inhibitoren, wie EDTA und Kupferionen, wurden für die Pink Envelope-Präparation aus folgenden Gründen außer acht gelassen: EDTA verursacht Veränderung in der

Zellwand, wie z.B. Extraktion von Lipopolysacchariden (Leive, 1965), und Cu^{++} wirkt als Lysozyminhibitor (Imoto et al., 1972).

Stamm	Präparationsschritte									n
	GB		GB (+PMSF(5mM))		Zw (+PMSF(5mM))		Triton-solubisat (+PMSF(2mM))	PE (+PMSF(2mM))		
	A	%	A	%	A	%	A	A	%	
R_1	176 (±24)	0	35 (±14)	80	22 (±9)	88	54 (±16)	3 (±0.7)	98	7
Sark	33 (±13)	0	6 (±3)	84	0	100	37 (±16)	0	100	7
Sark (CL^-)	10	0	1	90	0	100	5	0	100	1
Sark (HPI^-)	17	0	0	100	0	100	10	0	100	1

Tabelle 6: Aktivität der Om-gebundenen Proteinase in einzelnen Präparationsschritten.
A = Aktivität in U/mg Protein; % = Inhibierung in Prozent, bezogen auf GB ohne Inhibitor; n = Anzahl der gemessenen Präparationen; GB = ganze Bakterien; Zw = Zellwände; PE = Pink Envelope

3.1.3.3 Bestimmung der Lipopolysaccharide (LPS) in verschiedenen Pink Envelope-Präparationen

Im Gegensatz zu der Auffassung, daß LPS bei *Deinococcus radiodruans* nicht vorhanden sind (Work und Griffiths, 1968: vergeblicher Nachweis des Heptoseanteils; Thompson, 1981: vergeblicher Nachweis des Lipid-A-Anteils), konnten hier LPS mit Hilfe der colorimetrischen KDO-Bestimmung (2.5.5) bei allen untersuchten Bakterien nachgewiesen werden. Der Stamm R_1 zeigt den größeren LPS-Gehalt bei den ganzen Zellen und die Sark-Mutante (HPI^-) den geringsten LPS-Gehalt

(siehe Tabelle 7). Im Laufe der Pink Envelope-Präparation sinkt der LPS-Anteil. Die Pink Envelopes sind generell ärmer an LPS als die ganzen Bakterienzellen. Dagegen weisen die Tritonsolubilisate der einzelnen Organismen hohe Werte an LPS auf. Das Detergens (Triton X-100) extrahiert einen Teil der LPS aus der Om. Dies wurde auch für Zellwand-Präparationen von *Escherichia coli*, wo nach der Behandlung mit Triton X-100 ca. 1/3 die LPS entfernt wurden (Schnaitman, 1971), beobachtet.

Stamm	Präparationsschritte				n
	GB	Zw	Tritonsolubilisat	PE	
	µg LPS/mg Protein				
R_1	34 (±1)	15 (±3)	77 (±3)	11 (±5)	4
Sark	23 (±1)	14 (±2)	88 (±4)	14 (±0.8)	4
Sark (CL^-)	17	6	120	0	1
Sark (HPI^-)	8	5	130	4	1

Tabelle 7: Quantitative Messung der LPS in verschiedenen Pink Envelope-Präparationen.
(n = Anzahl der Beobachtungen bzw. Präparationen)
GB = ganze Bakterien; Zw = Zellwände; PE = Pink Envelope; nach Triton
LPS= Lipopolysaccharide

3.1.3.4 Bestimmung der Zucker in verschiedenen Pink Envelope-Präparationen

Der Stamm R_1 weist den größten Anteil an reduzierenden Zuckern auf (siehe Tabelle 8). Die Zucker der dicken Kohlenhydratkapsel tragen zu diesem hohen Wert bei. Die Mutante

Sark (CL^-) dagegen zeigt den kleinsten Wert an Zuckern, dort fehlt die Kohlenhydratkapsel mit seinen Polysaccharidketten. Sark selbst besitzt eine dünnere Kohlenhydratkapsel (siehe auch 3.1.1) als R_1, was mit den gemessenen Zuckeranteilen an den ganzen Zellen korreliert. Während der Präparation der Pink Envelope ist allgemein ein Verlust an Zuckern festzustellen. Die Anwesenheit von Zuckern in der Pink Envelope ist im Einklang mit Resultaten, die durch Thompson (1981) an *Deinococcus radiodurans* Sark erzielt wurden. Der Autor findet in der Om + HPI-Layer reduzierenden Zucker (identifiziert als Glucose), weiterhin im IM unbekannte saure Zuckerkomponenten,aber unterscheidbar von Glucuronsäure und Galacturonsäure. Festzuhalten ist, daß Triton X-100 die Zuckerkomponenten der Zellwände mit extrahiert. Die nachgewiesenen reduzierenden Zucker in den Zellwänden dürften nicht den Zuckeranteil des Mureins beinhalten. Die beiden nicht reduzierenden Saccharide des Mureins (Muraminsäure und Glucosaminsäure (Brooks et al., 1980) müßten zuerst desaminiert werden, um mit dem Phenolreagenz (2.5.4) zu reagieren und quantitativ erfaßt zu werden (Lee und Montgomery, 1961).

Stamm	Präparationsschritte				n
	GB	Zw	Tritonsolubilisat	PE	
	µg Saccharid/mg Protein				
R_1	575 (±25)	345 (±45)	165 (±85)	50 (±30)	2
Sark	295 (±54)	130 (±41)	58 (±28)	30 (±16)	4
Sark (CL^-)	73	28	9	5	1
Sark (HPI^-)	180	50	30	2	1

Tabelle 8: Quantitative Messung der reduzierenden Saccharide in verschiedenen Pink Envelope-Präparationen.
(n = Anzahl der Beobachtungen bzw. Präparationen)
GB = ganze Bakterien; Zw = Zellwände; PE = Pink Envelope

3.1.3.5 Infrarot-Spektroskopie

3.1.3.5.1 Vergleich der Zellwand- und Pink Envelope-IR-Spektren vor und nach Tritonbehandlung (R_1, Sark)

Der Vergleich zwischen den Stämmen Sark und R_1 ist in Tafel 17 zusammengefaßt. Qualitative Unterscheidungsmerkmale zwischen den Spektren dieser beiden Stämme sind nicht vorhanden. Die Ergebnisbeschreibungen in dem Text gelten für beide.

Die Zellwände, erhalten nach der Tritonbehandlung, unterscheiden sich von denen vor der Behandlung in erster Linie durch einen Verlust an Lipiden (Tafel 17, Abb. A, B und Tabelle 9). Der Lipidanteil ist vorwiegend durch die Estercarbonylbande bei 1735 cm^{-1} dargestellt. Weiterhin wird die Lipidpräsenz durch die Bandenlagen bei 2920 cm^{-1} und 2855 cm^{-1} und deren Intensität gekennzeichnet. Nach der Detergensbehandlung der Zellwände nehmen diese drei Banden deutlich an Stärke ab (Tafel 17, Abb. C und D). Gemeinsam zeigen die Zellwände vor und nach Triton eine starke Kontamination mit Murein (siehe Mureinspektren, Tafel 17, Abb. E und F). Den deutlichsten Kontaminationsbereich stellt die breite Bandenlage bei 1145 - 1035 cm^{-1} dar. Dieser Bereich ist durch ein Maximum bei 1060 cm^{-1}, Schultern bei 1145 cm^{-1}, 1110 cm^{-1}, 1035 cm^{-1} geprägt und charakteristisch für den Glycananteil des Mureins (Formanek et al., 1974). Das Mureinspektrum zeigt weiterhin Maxima für die Amid I- und Amid II-Regionen bei jeweils 1650 cm^{-1} und 1530 cm^{-1}. Diese Maxima sind in den Amid I- und II-Banden der Zellwände erkennbar. Die konformationsabhängigen Amid I- und II-Bereiche (siehe Tafel 6) deuten bei den Zellwand-Spektren auf Proteine mit ß-Struktur (Schultern bei 1690 cm^{-1}, 1630 cm^{-1} und 1525 cm^{-1}).

Der Saccharidanteil bei den Zellwänden kann nicht qualitativ ermittelt werden, da der Anteil des Mureins den Bereich bei 1070 - 1040cm^{-1} zu intensiv überlagert.

Die Pink Envelope, gewonnen aus Zellwänden ohne und mit Tritonbehandlung, zeigen einige qualitative Unterschiede (Tafel 17, Abb. G, H, I, J). Der Lipidanteil charakterisiert durch die Bandenlagen bei 2920 cm^{-1}, 2855 cm^{-1} und 1735 cm^{-1} bleibt nur bei den Pink Envelope aus Zellwänden ohne Detergensbehandlung erhalten, und zwar in dem gleichen Verhältnis wie bei den Zellwänden (siehe Tabelle 9). Hingegen sind Lipide bei der Pink Envelope aus Zellwänden mit Triton im Spektrum unkenntlich. Die typischen Banden fehlen.

Die unterschiedlich gewonnenen Pink Envelope unterscheiden sich weiterhin durch ihren Zuckeranteil. Der Glycananteil des Mureins (Bandenlage 1145 - 1035 cm^{-1}) und die Amid I- und II-Maxima, jeweils bei 1650 cm^{-1}, 1530 cm^{-1}, sind im Spektrum einer Pink Envelope aus Zellwänden ohne Triton X-100 noch sichtbar. Die Pink Envelope aus Zellwänden mit Triton X-100 behandelt zeigen diese Symptome der Mureinkontamination nicht. Dort zeigt der Saccharidbereich ein Maximum bei 1055 cm^{-1}, und die Maxima der Amid I- und II-Banden sind jeweils auf 1645 cm^{-1}, 1525 cm^{-1} verlagert. Der ß-Anteil der PEp-Proteine ist in verstärkter Weise ersichtlich, sowohl bei der Pink Envelope aus Zelländen mit Triton X-100 als auch bei den Zellwänden und Pink Envelope aus Zellwänden ohne Detergenseinwirkung durch die verdeutlichten Schultern bei 1630 cm^{-1} und die Verschiebung der Bandenlage in der Amid II-Region auf 1525 cm^{-1}.

Zusammenfassend:

- Die Tritonbehandlung der Zellwände extrahiert zusätzlich einen großen Teil der Lipide aus der äußeren Membran.
- Die Detergensbehandlung der Zellwände mit Triton X-100 begünstigt auf eine ungeklärte Weise den quantitativen Abbau des Mureins durch Lysozym.

- Sowohl die Zellwände wie die Pink Envelope mit oder ohne Tritonbehandlung weisen auf Proteine mit relativ hohen ß-Anteilen hin.

Probe	Stamm R_1		Stamm Sark	
	Lipid (%)	Protein (%)	Lipid (%)	Protein (%)
Zw	15	85	13	87
Zw nach Triton X-100	3	97	2	98
PE	15	85	11	89
PE aus Zw nach Triton X-100	n.m	100	n.m	100

Tabelle 9: Relatives Lipid/Protein-Verhältnis in Prozent ausgedrückt (siehe 2.11.1.2.4) (n.m = nicht meßbar).
(NB: Bei den Zw sind die Peptidanteile des Mureins im Amid I-Bereich beinhaltet)
Zw = Zellwände; PE = Pink Envelope.

3.1.3.5.2 Vergleich der IR-Spektren aus dem Tritonsolubilisat und der Lysozymphase von Zellwänden (Sark)

Die beiden präsentierten Spektren sind vorwiegend Saccharidspektren mit den charakteristischen Bandenlagen bei 3400 - 3300 cm^{-1} und 1050 cm^{-1} (Tafel 18, Abb. B, C). Die Spektren ähneln sich vor allem in der Saccharidfingerprintregion. Der Hauptanteil an Zucker bei der Lysozymphase stammte aus

dem Mureinabbau. Der Saccharidanteil des Tritonsolubilisats dürfte weitgehend aus der Kohlenhydratkapsel stammen (siehe 3.1.3.1). Die Feststellung, daß das Tritonsolubilisat qualitativ Saccharide beinhaltet, ist im Einklang mit den quantitativen Ergebnissen aus 3.1.3.4. Das abgebildete reine Tritonspektrum (Abb. A) soll nur die Güte der Detergensextraktion (siehe 2.11.5.2) in dem Spektrum (Abb. B) wiederspiegeln. Die Hauptbanden des Detergens bei 2960 cm^{-1}, 1510 cm^{-1}, 1240 cm^{-1} und 1150 - 1100 cm^{-1} (Abb. A) sind im Tritonsolubilisatspektrum abwesend (Abb. B).

3.1.3.5.3 IR-Spektren aus der Phenol- und Chloroform/Methanol-Extraktion an der Pink Envelope (Sark)

Das Spektrum aus der wässerigen Phase einer heißen Phenolextraktion aus der gereinigten Pink Envelope ist ein Saccharidspektrum mit den charakteristischen Bandenlagen bei 3400 - 3300 cm^{-1} und 1060 cm^{-1} (Tafel 18, Abb. E). Das Vorhandensein von Sacchariden in der Pink Envelope ist im Einklang mit den quantitativen Resultaten der Saccharidbestimmung (3.1.3.4). Erwähnenswert ist die Präsenz von Proteinanteilen in dem Spektrum (Amid I bei 1650 cm^{-1}, Amid II bei 1530 cm^{-1}), vermutlich Glykoproteine.

Die beiden Spektren der Chloroform/Methanol-Phase sind reine Lipidspektren (Tafel 18, Abb. F, G). Die charakteristischen Hauptbanden bei 2920 cm^{-1}, 2850 cm^{-1}, 1735 cm^{-1} sind deutlich hervorgehoben. Es ist zu bemerken, daß die Lipidspektren der Pink Envelope aus Zellwänden mit oder ohne Tritonbehandlung keine qualitativen Unterschiede aufweisen. Ein Anteil an Sacchariden ist im Spektrum festzuhalten (Bandenlage bei 3400 - 3300 cm^{-1} und 1060 - 1040 cm^{-1}). Der Bereich von 1060 - 1040 cm^{-1} wird auch von den Phosphatgruppen der Phospholipide überlagert. Bemerkenswert ist die

Bandenlage bei 3310 - 3300 cm^{-1}, sie ist als kleine Schwingungskomponente am besten bei dem Spektrum (Abb. F) sichtbar, sie deutet auf ungesättigte Fettsäuren hin. Solche ungesättigten Fettsäuren sind bei *Deinococcus radiodurans* beschrieben worden (Brooks et al., 1980; Knivett et al., 1965; Girard, 1971). Das Spektrum der Pink Envelope nach der Lipidextraktion beweist die Güte der Extraktion (Abb. H). Anhand der Amid I-Region ist es ersichtlich, daß die PEp-Proteine ihren ß-Anteil beibehalten haben.

Die Lipidzusammensetzung von *Deinococcus radiodurans* Sark wurde eingehend von Thompson et al. (1980), Thompson (1981) untersucht. Der Autor stellte 13 polare Lipide (5 Phosphoglycolipide, davon 3 in der Om, 4 Glycolipide und 1 Phosphosulfolipid) und apolare Lipide (z.B. Carotinoide für Cm und für Om) fest. Der Hauptzuckeranteil der Lipide wurde als Glucose bestimmt. Der Verfasser schlägt die Präsenz von alkalisch labilen Esterbindungen bei den Lipiden vor. Diese Vermutung kann hier in dieser Arbeit anhand der IR-Spektroskopie verifiziert werden (Bandenlage bei 1735 cm^{-1}). Schließlich beschreibt Thompson, daß *Deinococcus radiodurans* eine bemerkenswerte Stellung gegenüber anderen Bakterien einnimmt. Übliche Lipide wie Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylserine und Phosphatidylinotisol sind nämlich bei diesem Bakterium nicht vorhanden.

Zusammenfassend:

- Die heiße Phenol-Extraktion belegt die Anwesenheit von Saccharidkomponenten in der gereinigten Pink Envelope. Vermutlich sind auch Glycoproteine vorhanden.

- Die Lipidextraktion beweist, daß ein Teil der Lipide noch nach der Tritonbehandlung der Zellwände in der Pink Envelope zurückbleiben.

- Diese Lipide setzen sich aus Glycolipiden und Phosphoglucolipiden zusammen. Die Präsenz von Lipopolysaccharidresten kann nicht eindeutig in den Spektren identi-

fiziert werden (siehe auch 3.1.3.3).

- Die Lipide besitzen gesättigte Esterbindungen.

3.1.3.5.4 Vergleich der Spektren aus gereinigten Pink Envelope (R_1, Sark, Sark (CL^-), Sark (HPI^-)

Die Pink Envelope-Spektren (Tafel 19, Abb. A bis D) aus den vier untersuchten Objekten unterscheiden sich insgesamt qualitativ nicht. Anhand der vor allem klaren Verhältnisse in den Amid I- und II-Regionen können Strukturaussagen zu den vorhandenen Proteinen gemacht werden (siehe Tafel 6). Die getroffene Aussage hat nur einen qualitativen Charakter, für eine quantitative Untersuchung wären Bandenformanalysen im Bereich Amid I und II Voraussetzung (Kleffel, 1980; Kleffel et al., 1985). Auffällig bei den Pink Envelope-Präparationen ist der Anteil an ß-Strukturen, gekennzeichnet durch die charakteristische Schulter bei 1690 - 1680 cm^{-1}; die Bandenlage bei 1630 cm^{-1} (hier als Schulter in der Amid I-Region angedeutet), weiterhin durch die Bandenlage bei 1525 cm^{-1} (auch dort als Schulter in Amid II-Region erkenntlich).

Die Mutante Sark (HPI^-) zeigt eine Verschiebung des Maximums für den Amid I-Bereich nach 1650 cm^{-1}. Der Hinweis auf ß-Struktur bleibt vorhanden trotz der Abwesenheit des HPI-Layers, der selbst 23 % ß-Strukturen besitzt (Baumeister et al., 1982; Karrenberg et al., 1982). Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß andere PEp-Proteine außer dem RS-Layer über Anteile an ß-Strukturen verfügen.

3.1.3.6 Kataloge der Pink Envelope-Protein (PEp-von R_1/Sark)

3.1.3.6.1 SDS-PAGE der PEp-Proteine

3.1.3.6.1.1 Kataloge der PEp-Proteine

Die Auftrennung der vorhandenen PEp-Proteine in der SDS-PAGE sind in Tafel 20 und 21 dargestellt. Die Tabelle 11 gibt einen Überblick über das gesamte Proteinvorkommen und deren Merkmale. Die einzelnen Proteine wurden nach einer einheitlichen Nomenklatur benannt, angelehnt an die, die für die Om-Proteine der Enterobacteriaceae gültig ist (Lugtenberg und Van Alphen, 1983). Da die hier vorgestellten Proteine nicht alle topographische Bestandteile der Om sind (siehe 3.2), wurde die übergreifende Bezeichnung PE anstelle von Om ausgewählt. Die Abkürzung (PEp) steht für "Pink Envelope Protein" und (pf) für "proteolytisches Fragment". Die Klassifizierung der Polypeptidkomponenten der Pink Envelope in Haupt- (M) und Nebenpolypeptide (m) beruht auf der Färbungsintensität der jeweiligen Polypeptide in der PAGE anhand der zwei unterschiedlichen Färbungsmethoden (Coomassie- und Silberfärbung (2.7.3)). Die Proteinkataloge (Tabelle 11) der beiden Stämme sind in ihrer Zusammensetzung sehr ähnlich. Sie setzen sich aus 4 Hauptpolypeptiden, 8 Nebenpolypeptiden und 3 bis 4 variablen Polypeptiden zusammen. Die Molekulargewichtskala, die durch diese abgedeckt wird, erstreckt sich auf ein Intervall von 120 bis 18 kD.

Von den vier Hauptpolypeptiden zeigen nur PEp B (HPI-Layer-Monomer), jeweils bei R_1 und Sark, eine abweichende Mobilität und ein unterschiedliches Molekulargewicht, PEp B (R_1): 104 kD, PEp B (Sark): 108 kD (siehe 3.1.2.3). Auffällig im Vergleich der Bandenmuster der Zellwand und Pink Envelope

zwischen R_1 und Sark ist, daß PEp B (R_1) sowohl bei Zellwand wie bei Pink Envelope nicht sichtbar vorhanden ist. Das HPI-Monomer ist stark proteolysiert (siehe 3.1.3.6.2) und nur das erste proteolytische Fragment des Polypeptids (PEp B pf 1) bleibt in der PAGE erkennbar. Hier darf in Erinnerung gebracht werden, daß eine erhöhte Proteinaseaktivität bei der Zellwand und Pink Envelope von R_1 übrig bleibt (3.1.3.2). Bei den Nebenpolypeptiden zeigen nur PEp G und K jeweils bei R_1 und Sark unterschiedliche apparente Molekulargewichte: PEp G (R_1): 37 kD, PEp G (Sark): 35 kD; PEp K (R_1): 23 kD, PEp K (Sark): 20 kD. Im Vergleich der beiden Stämme zueinander weisen alle übrigen Polypeptide keine Unterschiede in ihrer apparenten Massengröße auf. Die drei (bei R_1) und vier (bei Sark) variablen Polypeptide sind minoritäre Komponenten, die nicht bei allen Präparationen regelmäßig auftreten. Sie stellen eventuell nicht identifizierte proteolytische Polypeptidfragmente dar.

Der Vergleich zwischen Sark und seinen Mutanten zeigt, daß außer bei Sark (HPI^-), der kein PEp B (HPI-Layer-Monomer) im Elektropherogramm aufweist (siehe auch 3.1.1), keine weitere Veränderung zu registrieren ist (Tafel 20, Abb. D).

Der Unterschied zwischen Zellwänden vor und nach der Tritonbehandlung beruht auf der Solubilisierung von Cmp-Proteinen (siehe 3.1.3.1 und Tafel 16, Abb. C). Von der Zellwand mit Triton X-100 behandelt zur Pink Envelope zeigen vor allem PEp E und PEp F eine Intensitätsabnahme nach der Lysozymreinigung in dem Pink Envelope-Bandenmuster (Tafel 20, Abb. A, B, C und Tafel 21, Abb. A, B). Die Gründe dafür sind in 3.1.3.6.1.2 erläutert. Nach einer optischen Beurteilung des Bandenmusters in der PAGE sind drastische Veränderungen von der Zellwand zur Pink Envelope nicht sichtbar. Um diese Beurteilung zu prüfen, wurden Elektropherogramme aus Zellwänden vor und nach Tritonbehandlung

wie Pink Envelope (mit Lysozym-Kontamination) densitometriert und quantitativ untersucht (siehe 2.7.5.2). Für diesen Zweck wurden ausschließlich Coomassie-gefärbte PAG zur Messung herangezogen. Der Vergleich wurde zwischen identischen Haupt - PEp - Proteinen aus Zellwänden und Pink Envelope hergestellt. Die Tabelle 10 faßt die Resultate für PEp A, B, C und D zusammen. Die prozentual ausgedrückten Verhältnisse beziehen sich auf die jeweils eingenommene Fläche eines Polypeptids zu der gesamten Fläche aller Polypeptide in einem Densitogramm. Der Wert, den jedes Polypeptid in Zellwand-Elektropherogrammen (mit oder ohne Detergensbehandlung) und in Pink Envelope-Elektropherogrammen einnimmt, bleibt nahezu konstant. Dieses bedeutet zweierlei: erstens, die Tritonbehandlung der Zellwände zerstört nicht das *in situ* Verhältnis der Hauptproteine zueinander; zweitens, der Übergang von Zellwand zur Pink Envelope nach der Verdauung und Entfernung des Mureins läßt keine gravierende Zerstörung dieses Verhältnisses erkennen. Der Präparationsweg, angewendet für die Herstellung der Pink Envelope, kann als schonend bezeichnet werden.

In den präsentierten Katalogen (für R_1 und Sark) kann zu zwei Hauptproteinen und einem Nebenprotein jeweils eine Funktion zugeordnet werden. Die Funktion einer 5'-Nucleotidase (5'-Ribonucleotide Phosphohydrolase, EC 3.1.3.3) kann dem PEp D-Protein zugeordnet werden (Mitchel, 1973). Der Autor stellte für das Zellwandenzym ein Molekulargewicht von 44 kD fest (ermittelt durch Gelchromatographie). Weiterhin kann eine (3'→ 5')-Exonuclease (Orthophosphorische Diester Phosphohydrolase, EC 3.1.4.1) als PEp A identifiziert werden (Mitchel, 1978; Ubrig, MPI München, persönliche Mitteilung). Mitchel beschreibt das Zellwandenzym als Monomer in der SDS-PAGE mit einem Molekulargewicht von 125 kD. Für eine präzise Identifikation dieser beiden Enzyme siehe 3.2.7. Die Om-Proteinase kann schließ-

lich anhand eines Mobilitätsvergleichs zwischen einem Pink Envelope-Elektropherogramm und einem Elektropherogramm der gereinigten Om-Proteinase von *Deinococcus radiodurans* als PEp P identifiziert werden (Emde, 1985).

Banden-bezeich-nung	Stamm R_1		Stamm Sark	
	Zw mit oder ohne Triton X-100	PE (+ Lysozym)	Zw mit oder ohne Triton X-100	PE (+ Lysozym)
PEp A	23 %	19 %	19 %	18 %
PEp B	proteolysiert	proteolysiert	3 %	4 %
PEp C	19 %	9 %	13 %	12 %
PEp D	13 %	12 %	17 %	16 %

Tabelle 10: Verhältnis der Haupt-PEp-Proteine in Densitogrammen der Zellwand und Pink Envelope bei R_1 und Sark.
(Die Prozentangaben beziehen sich auf die Peakfläche der einzelnen Polypeptide zur jeweiligen Gesamtfläche des zugehörigen Densitogramms eines Elektropherogramms)
Zw = Zellwand; PE = Pink Envelope.

Banden-bezeich-nung (1)	*Deinococcus radiodurans* Stamm R_1				Banden-bezeich-nung (1)	*Deinococcus radiodurans* Stamm Sark			
	MGapp(kD)	Klassifi-zierung	proteolytische Fragmente (2)	Bemerkungen		MGapp(kD)	Klassifi-zierung	proteolytische Fragmente (2)	Bemerkungen
PEp A	120	M	PEpApf 1 (94 kD) PEpApf 2 (90 kD) PEpApf 3 (75 kD)	(3'— 5')-Exonuclease (3)	PEp A	120	M	PEpApf 1 (94 kD) PEpApf 2 (90 kD) PEpApf 3 (75 kD)	(3'— 5')-Exonuclease (3)
PEp B	104	M	PEpBpf 1 (91 kD)	RS-Layer-Monomer, stark proteolysiert	PEp B	108	M	PEpBpf 1 (98 kD)	RS-Layer-Monomer(*)
PEp C	64	M	PEpCpf 1 (60 kD) PEpCpf 2 (57 kD) PEpCpf 3 (55 kD)	-	PEp C	64	M	PEpCpf 1 (60 kD) PEpCpf 2 (57 kD) PEpCpf 3 (55 kD)	-
(PEp var_1)	52	-	-	-	(PEp var_1)	52	-	-	-
PEp D	47	M	-	5'-Nucleo-tidase (3)	PEp D	47	M	-	5'-Nucleo-tidase (3)
PEp E	43	m	-	-	PEp E	43	m	-	-
PEp F	40	m	-	-	PEp F	40	m	-	-
PEp G	37	m	-	andere Mobi-lität als PEp G - Sark	PEp G	35	m	-	andere Mobi-lität als PEp G - R_1
PEp H	34	m	-	-	PEp H	34	m	-	-
PEp I	33	m	-	-	PEp I	33	m	-	-
(PEp var_2)	31	-	-	-	(PEp var_2)	31	-	-	-
PEp P	30	m	-	Om-Proteinase (3)	PEp P	30	m	-	Om-Proteinase (3)
PEp J	29	m	-	-	PEp J	29	m	-	-
PEp K	23	m	-	andere Mobi-lität als PEp K - Sark	PEp K	20	m	-	andere Mobi-lität als PEp K - R_1
(PEp var_3)	-	-	-	-	(PEp var_3)	19	-	-	-
(PEp var_4)	18	-	-	-	(PEp var_4)	18	-	-	-

Tabelle 11: Kataloge der PEp-Proteine aus *Deinococcus radiodurans* Stamm R_1 und Sark

(1) Erläuterung zur Nomenklatur: PEp = Pink Envelope-Protein
pf = proteolytisches Fragment
var = variables Polypeptid

(2) Diese proteolytischen Fragmente wurden anhand von zweidimensionalen Peptide Maps ermittelt (siehe 3.1.3.6.2)

(3) Literaturangabe im Text(3.1.3.6.1.1)
Abkürzungen: M = Hauptprotein
m = Nebenprotein

(*) bei der Mutante *Deinococcus radiodurans* Sark (HPI^-) enthält der PEp-Katalog kein RS-Layer-Monomer (HPI-Layer-Monomer): PEp B (siehe auch Tafeln 20 und 21)

3.1.3.6.1.2 Lysozym-Reinigung der Pink Envelope

Nach Beendigung einer Pink Envelope-Präparation und Entfernung des überschüssigen Lysozymanteils (siehe Präparationsschema, Tafel 3) bleibt Lysozym in großen Mengen auch nach mehreren Waschgängen an der Pink Envelope haften und läßt sich nicht quantitativ entfernen (Tafel 21, Abb. A und B). Dieser Effekt wurde schon bei *Salmonella typhimurium* beschrieben (Osborn et al., 1972). Die elektrophoretische Untersuchung der Lysozym-Phase, gewonnen nach der Pink Envelope-Herstellung, zeigt bei allen Stämmen das gleiche Bild (Tafel 21, Abb. C, D und E). Hauptsächlich beinhaltet das Mureinhydrolysat drei PEp-Polypeptide: PEp C begleitet von seinen proteolytischen Fragmenten PEp C pf_1 und PEp C pf_2 und schließlich PEp E (bei Sark hier nicht sichtbar) und PEp F. Erst die Behandlung der Pink Envelope mit KCl (0.2 M), nach der Entfernung des Lysozymhydrolysats, bewirkt eine quantitative Entfernung der Muramidase aus der Pink Envelope. Die gleichen PEp-Polypeptide (wie oben erwähnt, d.h. PEp C, E und F) begleiten das Enzym im KCl-Solubilisat (Tafel 21, Abb. C, D, E). Zusätzlich sind Spuren des PEp J-Proteins in den Elektropherogrammen zu verzeichnen.

Lysozym spaltet die (ß 1→ 4) glykosidischen Bedingungen des Mureins zwischen der N-Acetylmuraminsäure und dem N-Acetylglucosamin und baut die Muropolysaccharidkette zu dem Disaccharid GlcNAc-MurNAc ab, an dem noch die Peptid-Seitenketten hängen (siehe Abb. 5 (A)). Diese Situation ist am Schluß der Lysozym-Inkubation der Zellwände erreicht. Lysozym + Disaccharid-Peptidketten-Reste (aus dem verdauten Murein) + PEp C, E und F liegen vermutlich als Komplexe vor, die durch ionische Wechselwirkungen an der Pink Envelope haften. Dieser Komplex muß wahrscheinlich in zwei Bereiche unterschieden werden: einerseits die Komplexbindung ([Lysozym - Disaccharid + Peptidketten]),

wobei das Enzym in Wechselwirkung mit seinem Substrat steht, und andererseits die Komplexbindung ([Disaccharid + Peptidketten-Reste mit den PEp-Proteinen C, E und F]). Als Indiz für die plausible Existenz eines solchen Komplexes fungiert das IR-Spektrum des KCl-Solubilisats (siehe Abb. 5 (C)). Dieses Spektrum gleicht dem von der Lysozym-Phase nach der Pink Envelope-Herstellung (siehe Tafel 18, Abb. C), bezogen auf die Saccharidfingerprintregion (Bandenlage bei 3400 - 3300 cm^{-1} als breite Schulter und breite Bande bei 1050 cm^{-1}). Das Spektrum ist vorwiegend ein Saccharidspektrum. Die Zuckerkomponenten dürften vorwiegend aus dem Abbau des Mureins stammen. Der im Schema dargestellte Komplex dürfte vorwiegend durch die Protein-Protein-Wechselwirkung der PEp C, E, F-Proteine mit anderen Proteinkomponenten der Pink Envelope (vermutlich aus der Om) an dieser haften. Erst die hohe Ionenstärke der eingesetzten Kaliumchloridwaschlösung sorgt für einen Zusammenbruch dieser Wechselwirkung und ermöglicht die quantitative Solubilisierung dieser Komplexe. Dieser Versuch deutet auf die Affinität von PEp C, E und F zum Murein. Sie sind ohne Einwirkung von Detergens oder chaotroper Reagenz mit dem verdauten Murein zum Teil isolierbar.

Banden-bezeichnung	Stamm R_1		Stamm Sark		Stamm Sark (CL^-)	
	Lysozym Hydrolysat	KCl Solubilisat	Lysozym Hydrolysat	KCl Solubilisat	Lysozym Hydrolysat	KCl Solubilisat
PEp C	+	+	+	+	+	+
$PEpCpf_1$	+	+	+	+	+	+
$PEpCpf_2$	+	+	+	+	+/-	+/-
PEp E	+	+	-	+	+	+
PEp F	+	+/-	+	+	+	+
PEp J	-	+/-	-	+	-	+

Tabelle 12: Vorkommen der PEp-Polypeptide in der Lysozym-Phase und dem KCl-Solubilisat nach der Pink Envelope-Herstellung (siehe auch Tafel 21, Abb. C, D, E).
(+ = vorhanden; +/- = gering vorhanden; - = nicht vorhanden.

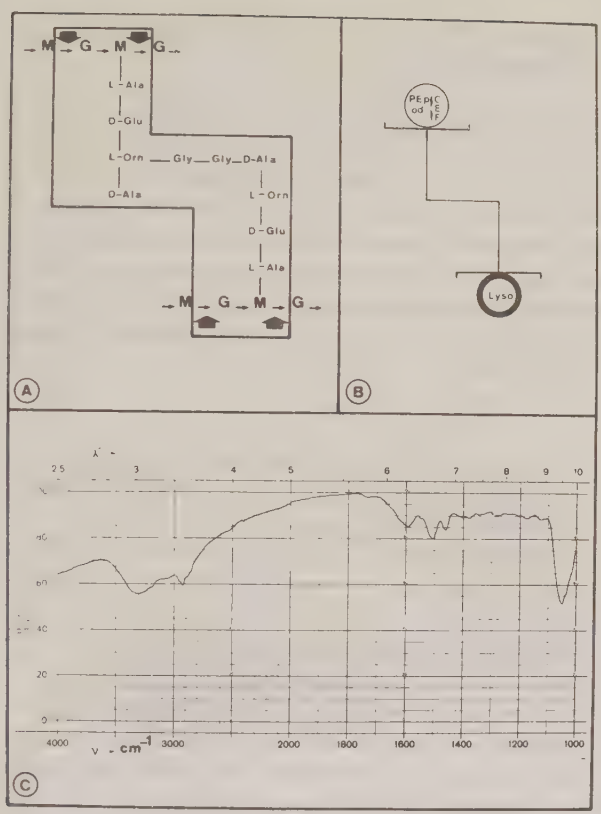


Abb. 5: A: Mureinabbauprodukt nach Lysozymeinwirkung.
B: Erläuterung zu möglicher Komplexbildung (Lysozym-Murein-abbauprodukte - PEp-Proteine).
C: IR-Spektrum des KCl-Solubilisats nach Pink-Envelope-Herstellung.
Erläuterungen: ◀: Angriffstelle von Lysozym an den spaltbaren Stellen (β 1→4) zwischen M und G.
- M = N.Acetylmuraminsäure
- G = N.Acetylglucosamin
- Das Schema in Abb. A benutzt die vorgeschlagene Primärstruktur des Mureins von "*Micrococcus radiodurans*" durch Schleifer und Kandler (1972).

PEp = Pink Envelope-Protein
Lyso = Lysozym

3.1.3.6.2 Peptide Mapping-Untersuchungen an den PEp-Proteinen

Die Aufstellung des Katalogs der Pink Envelope aus einem Stamm wäre ohne eine genaue Charakterisierung jedes einzelnen Polypeptids mit Hilfe der Peptid Mapping-Technik nicht möglich gewesen. Die hiermit erzielten Ergebnisse ergeben zwei wichtige Informationen: erstens über den Verwandtschaftsgrad zwischen den Proteinen; zweitens über das Vorhandensein von proteolytischen Fragmenten im Bandenmuster (in der SDS-PAGE) der zu untersuchenden Zellwände oder Pink Envelope.

3.1.3.6.2.1 Peptide Mapping von einzelnen extrahierten PEp-Proteinen

Folgende Polypeptidbanden wurden aus der ersten Dimension der SDS-PAGE extrahiert und der Peptide Mapping-Technik unterzogen: PEp A, B pf_1, A pf_3, C, D, E und J für R_1, und PEp A, B, C, C pf_1, D, E, F und J für Sark (siehe Tafel 22, Abb. A und B). Die Ergebnisse der erhaltenen Peptide Maps sind in Tafel 22, Abb. C und D dargestellt. Die Spaltfragmente einzelner Hauptpolypeptide von R_1 (PEp A, C und D) (Tafel 22, Abb. C) weisen auf keine Verwandtschaft untereinander hin. Die gleiche Aussage trifft für das Nebenpolypeptid PEp E zu. Das Fragmentmuster von PEp A pf_1 beinhaltet nur ein 70 kD-Spaltprodukt. Dieses ist gleich dem von PEp A zu setzen (sowohl von der Mobilität wie von der Färbungsintensität und Form der Bande zu urteilen). PEp A pf_1 ist als proteolytisches Spaltprodukt von PEp A einzuordnen. Alle vier Hauptpolypeptide PEp A, B, C und D von Sark zeigen keinerlei Verwandtschaftsbeziehungen aufgrund von gleichen Spaltmustern (Tafel 22, Abb. D). Eine identische Aussage kann für die zwei Nebenkomponenten PEp E und F getroffen werden. Ähnlich wie für R_1 weist

PEp A pf_3 das gleiche Spaltprodukt (70 kD) wie bei PEp A auf. PEp A pf_3 ist ein proteolytisches Abbauprodukt aus PEp A, PEp C pf_1 zeigt mit den Spaltprodukten 45 kD einen hohen Verwandtschaftsgrad mit PEp C. Dieses Polypeptid ist ein proteolytisches Fragment aus PEp C.

Die Abb. E in Tafel 22 vergleicht paarweise einige Polypeptide aus beiden Stämmen. Aufgrund von weitgehend identischen Spaltfragmentmustern zeigen folgende Polypeptide beider Stämme einen hohen Homologiegrad: PEp A (R_1) und PEp A (Sark) sowie PEp E (R_1) und PEp E (Sark) und schließlich PEp J (R_1) und PEp J (Sark). PEp D (R_1) und PEp D (Sark) zeigen anhand des Spaltfragmentmusters eine deutliche Verwandtschaft. Allerdings zeigen die folgenden Spaltfragmente unterschiedliche Molekulargewichte: für PEp D (R_1) zwei Spaltfragmente bei 38 kD und 33 kD und für PEp D (Sark) zwei Spaltfragmente bei 40 kD, 35 kD und zusätzlich ein schwaches Spaltprodukt bei 38 kD.

3.1.3.6.2.2 Peptide Mapping aller PEp-Proteine aus Zellwänden und Pink Envelope

Diese zweidimensonale Technik erlaubt den Vergleich aller aufgetrennten Polypeptide eines Systems (Zellwand oder Pink Envelope) auf einen Blick. Die Ergebnisse aus solchen Untersuchungen sind in Tafel 23 dargestellt. Die Auswertungen der Bilder wurden für die Korrelationswerte mit Hilfe des GELKORIX-Programms durchgeführt (siehe 2.7.5.3 und Tafel 24 und 25). Die tabellarisch zusammengefaßten Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Übereinstimmung in der Mobilität zwischen den Kolonnen, ohne eine definitive Aussage über eine Verwandtschaftsbeziehung auszudrücken (siehe Tafel 25). In den Peptide Maps der Polypeptide aus Zellwänden und Pink Envelope (R_1 und Sark) erkennt man die Spaltprodukte, erhalten mit den extrahierten Hauptpolypep-

tiden (PEp A, B, C, D) (siehe 3.1.3.6.2.1). PEp A und seine proteolytischen Fragmente (PEp A pf_1, pf_2, pf_3) sind deutlich im oberen Molekulargewichtsbereich (gemeinsames Spaltfragment bei 70 kD) bei Zellwänden und Pink Envelope (R_1 und Sark) zu sehen. Die Abb. C in Tafel 23 verdeutlicht durch die schwarzen Pfeile die Position dieser Fragmente aus PEp A. Ein klares Bild ergibt sich für PEp C und seine proteolytischen Abbauprodukte am deutlichsten bei den Zellwänden (Sark) (Tafel 23, Abb. B). PEp C pf_1 und PEp C pf_2 (beide proteolytische Fragmente) zeigen gleichzeitig hohe Korrelationswerte mit PEp C für beide Normierungsarten (siehe Tafel 25, B). Alle Haupt-PEp-Proteine eines Stammes zeigen keine Verwandtschaft untereinander. Die gleiche Aussage trifft auch für die Neben-PEp-Proteine zu. Ein klares Bild über deren Peptide Maps ist jeweils bei den Zellwänden jedes Stammes zu beobachten. Für beide Stämme sind PEp E, F, G, H, I, J und K als eigenständige Polypeptide einzuordnen. Zwar zeigen diese Polypeptide zum Teil untereinander erhöhte Korrelationswerte (siehe Tafel 25), aber die optische Auswertung der Spaltprodukte (anhand der Form und Färbungsintensität jeder Bande in der SDS-PAGE) unterstreicht nicht die Aussage über eine Homologie. Eine besondere Bedeutung in den Peptide Maps nimmt das PEp B-Polypeptid (HPI-Layer-Monomer) von R_1 ein, nur das proteolytische Spaltfragment PEp B pf_1 ist im gesamten Spaltmuster von Zellwänden und Pink Envelope zu erkennen. Auffällig bei den erhaltenen Peptide Maps ist, daß die maximale erreichbare Proteolyse unter den gegebenen Präparationsbedingungen gleich bei den Zellwänden und Pink Envelope ist. Der Peptide Map-Fingerprint einer Pink Envelope ist im gesamten Umfang in der Zellwand erkennbar.

3.1.3.6.3 Homologie-Studie an den HPI-Layer-Proteinen (PEp B) aus R_1 und Sark: Peptide Mapping und Proteinase-Verdauung an den isolierten HPI-Layers

3.1.3.6.3.1 Peptide Mapping an den HPI-Layer-Proteinen

In der Besprechung der PEp-Kataloge aus den Stämmen R_1 und Sark wurde der Homologiegrad zwischen den Polypeptiden PEp B zuerst außer acht gelassen. Diese beiden Proteine wurden separat näher untersucht. Die Peptide Maps aus PEp B aus R_1 und Sark sind in Tafel 26, Abb. A dargestellt. Auffällig ist es, daß die beiden Urpolypeptide einige Homologien aufweisen. Das Auftreten der Spaltfragmente 70 kD, 55 kD, 47 kD, 14 kD und letztlich 12 kD spricht dafür. Die Peptide Maps des PEp B pf_1 (R_1) zeigen einen höheren Homologiegrad als PEp B (R_1) zu PEp B und PEp B pf_1 (Sark), folgende Spaltfragmente mit gleicher Mobilität führen zu dieser Feststellung: 70 kD, 55 kD, 47 kD, 45 kD, 30 kD, 27 kD, 25 kD, 15 kD, 14 kD, 12 kD (Tafel 26, Abb. A). Es gelang, mit dieser chemischen Hydrolyse von Peptidbindungen die Identifikation und eindeutige Zuordnung von PEp B pf_{13} zu dem Monomer PEp B (R_1) zu zeigen. Die Spaltfragmente, erzeugt bei PEp B pf_{13} (14 kD und 12 kD), sind bei PEp B und PEp B pf_1 vorhanden (siehe Abb. A in Tafel 26). Dieser Nachweis gelang nicht mit enzymatischen Hydrolysen von Peptidbindungen wie z.B. mit V 8-Proteinase. Das Fragment PEp B pf_1 ließ sich nicht spalten (Karrenberg, 1981; Rachel, 1982). Die Abb. B in Tafel 26 zeigt Peptide Maps aller Polypeptide aus dem HPI-Layer-Protein (R_1) präpariert ohne Inhibitor. Die Verwandtschaftsbeziehungen der proteolytischen Fragmente sind eindeutig für PEp B, PEp B pf_1, PEp B pf_5, PEp B pf_9 und PEp B pf_{13}. Die restlichen proteolytischen Abbauprodukte haben viele Spaltfragmente mit gleicher Mobilität, mit den zuletzt erwähnten proteolytischen Abbau-

produkten gemeinsam (für die Korrelationswerte siehe Tafel 27 und 28). Die Abb. C in Tafel 26 präsentiert das gesamte Peptide Map der proteolytischen Fragmente aus dem HPI-Layer-Protein (Sark), gewonnen ohne Inhibitor, und die Abb. D das aus dem HPI-Layer-Protein, erhalten mit Inhibitor. Der Effekt der Inhibierung der Proteolyse während einer HPI-Layer-Präparation spiegelt sich in der Abb. D wider. PEp B ist als Monomer fast unproteolysiert gut sichtbar. Nur die schwachen Polypeptidfragmente wie PEp B pf_1, pf_4, pf_5, pf_7 und PEp B pf_{11} bleiben als proteolytische Fragmente übrig. Deren charakteristische Spaltfragmente sind im Peptide Map gut erkennbar, auch in Abb. C (für die Korrelationswerte siehe Tafel 27 und 28).

3.1.3.6.3.2 Proteinase-Verdauung an dem isolierten HPI-Layer (R_1 und Sark)

Die Peptide-Mapping-Experimente, dargestellt in 3.1.3.6.3.1, zeigen einige Unterschiede zwischen den beiden HPI-Layer-Proteinen. Dies führte zu folgendem Experiment (siehe 2.12). Eine limitierte Proteolyse des undissoziierten Layers mit der gemeinsamen gereinigten Om-Proteinase aus R_1 wurde durchgeführt. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tafel 29, Abb. C und D jeweils für R_1 und Sark dargestellt. Für beide Stämme wurden HPI-Layer-Präparationen mit Inhibitorzusatz verwendet (siehe 3.1.2.3). Das Ziel des Versuchs war, die jeweiligen Proteine auf deren Homologie näher zu untersuchen. Die begrenzte Proteolyse, erzielt bei R_1, zeigt einen fortgeschrittenen Abbau des Proteins in proteolytische Untereinheiten. Nur zwei neue proteolytische Fragmente tauchen im Bandenmuster auf, nämlich bei 95 kD und 61 kD. Alle übrigen Fragmente erscheinen auch in dem proteolytischen Abbaumuster einer HPI-Layer-Präparation, die ohne Inhibitorzusatz gewonnen wurde, nur die Mengenverhältsnisse der einzelnen Fragmente sind durch die fortschreitende

Proteolyse verändert worden. Die drastischsten Veränderungen sind bei der Intensitätsabnahme von PEp B, PEp B pf_1, pf_5 zugunsten einer Intensitätszunahme der Polypeptide PEp B pf_2, pf_7, pf_9 zu beobachten. Die begrenzte Proteolyse des HPI-Layers (Sark) zeigt eine komplette Verdauung des Monomers PEp B zu PEp B pf_1 und PEp B pf_2. Alle übrigen proteolytischen Fragmente sind identisch mit denen, die während einer Präparation ohne Inhibitor *in vitro* erzeugt werden.

Die Verdauungsversuche mit unterschiedlichen kommerziellen Proteinasen zeigen limitierte Proteolysen der beiden Layer, wobei die einzelnen erzeugten Fingerprints zwischen beiden Stämmen nicht deckungsgleich sind (siehe auch Rachel, 1982). Die eindeutig stammspezifischen Bandenmuster, erzielt einerseits nachträglich *in vitro* mit der extrahierten Proteinase (aus R_1), andererseits mit kommerziellen Proteinasen, deuten darauf hin, daß beide Proteine mit einigen Unterschieden homolog sind. Dieses Faktum scheint der Vorstellung zu widersprechen, daß beide Proteine identisch sind und *in vivo* durch unterschiedliche Proteinase verdaut werden (Rachel, 1982; Rachel et al., 1983). Wenn diese Annahme zutreffen würde, dann wäre das folgende Ergebnis zu erwarten gewesen: das HPI-Layer-Protein von Sark, verdaut im Reagenzglas mit der Om-Proteinase aus R_1, müßte ein identisches Spaltmuster wie das von R_1 ergeben (unter gleichen experimentellen Bedingungen).

Zusammenfassung:

- Die Peptide Maps aus beiden HPI-Layer-Proteinen deuten auf die Existenz von einigen homologen Bereichen in der Sequenz.
- Das Spaltfragment bei dem HPI-Layer-Protein (R_1), PEp B pf_{13} ist als proteolytisches Abbauprodukt vom Monomer PEp B anzusehen.

- Die limitierten Verdauungen mit unterschiedlichen Proteinasen erzeugen stammspezifische Spaltfragmente für beide Proteine.
- Die begrenzten Proteolysen, erzielt mit der gemeinsamen Proteinase aus R_1, erzeugen Spaltmuster, die mit denen in den jeweiligen Elektropherogrammen von proteolysierten HPI-Layer-Proteinen identisch sind. Dieser Befund deutet auf das Vorhandensein dieses Enzyms bei den beiden Stämmen hin und unterstützt die Vermutung, daß diese Proteinase als Urheber der *in vitro* Proteolyse in Frage kommt.

3.2 Topographie (Sark)

3.2.1 Temperaturabhängige Dissoziationsreihe der Pink Envelope

Dieser Versuch diente einerseits der Affinitätsaufdeckung von PEp-Proteinen an dem HPI-Layer in Anwesenheit von SDS und andererseits der Ermittlung von hitzemodifizierbaren Proteinen in dem PEp-Proteinkatalog. Die Elektropherogramme sind in Tafel 30 (Abb. A und B) zusammengefaßt. Die Sedimente, erhalten bei den unterschiedlichen Solubilisierungstemperaturen bis 60°C, bestanden aus HPI-Layer-Fladen. In Anwesenheit von EDTA dissoziiert der HPI-Layer zum Teil ab 60°C (Karrenberg, 1981; Baumeister et al., 1982). Der erhaltene HPI-Layer weist zwei Polypeptidkontaminationen auf, nämlich PEp A und PEp K (siehe Tafel 30, Abb. A). Die beiden Proteine haben eine hohe Affinität zu dem HPI-Layer-Protein. Diese Wechselwirkungen wurden zum Teil bei niedrigen Temperaturen in Anwesenheit von SDS aufgehoben, vollständig aber nur bei Solubilisierungstemperaturen, höher als 40°C für PEp A bzw. 30°C für PEp K. Die Wechselwirkungen von PEp A und PEp K mit dem Layer sind offenbar keine Artefakte durch willkürliche Reaggregation. Ihre Nachbarschaft zu dem Layer wurde durch die Vernetzungsexperimente erhärtet (siehe 3.2.3.2). Eine PEp A-Kontamination bei HPI-Layer-Präparationen, gewonnen mit LiDS, wurde von Rachel (1982) beschrieben. Die elektrophoretische Untersuchung des Pink Envelope-Solubilisats zeigt, daß folgende Polypeptide schon bei 25° - 30°C zum Teil dissoziiert vorliegen, PEp C (mit PEp C pf_1), PEp D (hm), PEp E, PEp F, PEp G, PEp J und PEp K (siehe Tafel 30, Abb. A, Abb. B und Tabelle C). Erst ab 40°C ist PEp A im Elektropherogramm gut sichtbar. Dieses Protein liegt vermutlich bei niedrigen Solubilisierungstemperaturen als große Aggregate vor, die nicht in die Gelmatrix des Trenngels eindringen können (siehe Tafel 30, Abb. A und B). Eine quantitative Dissoziation der gesamten PEp-Proteine wird erst bei 80°C erreicht.

Eine Sonderstellung im Bandenmuster nimmt PEp D ein. Das Polypeptid kann unter bestimmten Bedingungen zwei unterschiedliche Mobilitäten in der SDS-PAGE einnehmen. Diese Mobilitäten sind temperaturabhängig und entsprechen apparenten Molekulargewichten von 45 kD und 47 kD (siehe Tafel 30, Abb A und B, Pfeilköpfchen). Bei niedrigen Solubilisierungstemperaturen überwiegt die höhere Mobilität (die breite Bande bei MG app = 45 kD). Dieser Zustand bleibt bis 40°C erhalten. Im Temperaturbereich von 40°C bis 80°C nimmt die kleinere Mobilität (die scharfe Bande mit MG app = 47 kD) zu, während die 45 kD-Bande langsam an Intensität in der SDS-PAGE abnimmt. Das PEp D-Protein ist hitzemodifizierbar in Anwesenheit von SDS. Dieses Phänomen in der SDS-PAGE wurde bei Omp-Proteinen von *Escherichia coli* (Nakamura und Mizushima, 1976) und von *Pseudomonas aeruginosa* (Hancock und Carey, 1979; Coulton und Wan, 1983) beobachtet.

3.2.2 Mureinassoziierte PEp-Proteine

3.2.2.1 Temperaturabhängige Extraktion der Zellwände mit SDS

Der Versuch dient zur Ermittlung und Darstellung von PEp-Proteinen, die eine Wechselwirkung bzw. Affinität zum Murein (PG) aufweisen. Mit Hilfe des Detergens SDS werden nach einer kompletten Delipidation der äußeren Membran alle PEp-Proteine der Zellwand, die nicht in Wechselwirkung mit dem Murein stehen, solubilisiert. Die Solubilisierung wird in Abhängigkeit von der Temperatur durchgeführt. Die nicht löslichen Anteile der Proben (d.h. HPI-Layer + Murein + assoziierte Proteine) können elektrophoretisch untersucht werden, indem das Murein durch die Muramidase (Lysozym) abgebaut wird. Dadurch läßt sich der undissoziierte HPI-Layer von dem verdauten Murein durch differentiale Zentrifugation abtrennen und isolieren. Die Versuchsdurchführung lehnt sich an die Beschreibung der Murein-Sacculi-Präparation (siehe 2.4.3) an, wobei hier folgende Solubilisierungstemperaturen ausgewählt wurden: 30° - 40° - 60° - 80° - 100°C.

Die Resultate dieser Versuche sind in Tafel 31 (Abb. A, B und C) dargestellt. Die temperaturabhängigen SDS-Solubilisate (Abb. A) zeigen in ihren Bandenmustern alle PEp-Proteine. Diese Proteine haben keine SDS-resistente Wechselwirkung mit dem Murein. Das PEp B-Polypeptid des HPI-Layer-Proteins wird erst bei der Solubilisierungstemperatur von 80°C in der PAGE deutlich sichtbar (siehe auch 3.2.1).

Die Lysozymphasen aus den verdauten Murein-Sacculi sind gesondert in Abb. B und C dargestellt. Zwei PEp-Polypeptide fallen in den Elektropherogrammen auf: zuerst ist PEp C, begleitet von seinen proteolytischen Fragmenten PEp C pf_1 und pf_2, in Wechselwirkung mit dem Murein bis zu einer Solubilisierungstemperatur von 40°C. Darüber hinaus wird die Assoziation zum Murein aufgehoben. Weiterhin zeigt PEp E eine stärkere Affinität zum Murein als PEp C. Die Bindung von PEp E zum Murein ist SDS-resistent und bleibt bis zu einer Temperatur von 100°C bestehen. Letztlich ist eine Kontamination des PEp B-Polypeptids im Bandenmuster über alle Solubilisierungstemperaturen hinweg zu verzeichnen. Das Vorhandensein dieses Polypeptids ist möglicherweise auf eine Teildissoziation und Reaggregation des Layers aus zerstörten Gitterbereichen (Aufreißstellen während der Zellwand-Präparation) zurückzuführen.

Das HPI-Layer-Protein, gewonnen nach dem Mureinabbau, zeigt Kontaminationen durch einige PEp-Polypeptide (siehe Tafel 31, Abb. A und Tafel 32, Abb. I). PEp A bleibt an dem Layer bis 40°C verankert (siehe auch 3.2.1). PEp C (mit PEp C pf_1), PEp E und PEp F bleiben mit dem HPI-Layer-Protein bis 80°C in Verbindung. Lysozym kontaminiert schließlich noch den Layer. Diese Kontamination beruht wahrscheinlich auf einer Reaggregation durch ionische Wechselwirkungen dieser Proteinkomplexe mit dem Layer.

3.2.2.2 Morphologische Auswirkungen der Extraktion der Zellwand mit SDS

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Sedimente nach der SDS-Extraktion zeigen Murein-Sacculi, begleitet von HPI-Layer-Fladen bis 80°C (siehe Tafel 32, Abb. A bis E). Die Murein-Sacculi bewahren bis zu einem gewissen Grad die Form der Bakterien. Sie sind zum Teil mit HPI-Layer-Fladen bedeckt, und oft liegen Fladen frei neben den Murein-Sacculi. Dieser Befund bleibt bis zu einer Solubilisierungstemperatur von 80°C unverändert. Ab dieser Temperatur dissoziiert der Layer in seine Bestandteile, wird solubilisiert, und nur nackte Murein-Sacculi bleiben zurück (Abb. E). Die Murein-Sacculi weisen Perforationen auf (Emde, 1980; Thompson und Murray, 1982). Der HPI-Layer bildet Moiré-Muster, auch auf den Sacculi, kann aber auch ohne ein Anzeichen von Störungen des Gitters glatt auf der Oberfläche des Sacculus gespannt sein. Die Adsorptionsflächen sind teilweise groß. Der HPI-Layer, gewonnen nach der Lysozym-Inkubation, ist frei von Murein-Sacculi. Das Gitter des Layers zeigt angelagertes Fremdmaterial bei allen Temperaturen (30°C bis 60°C) (siehe Abb. F, G und H). Das Elektropherogramm (Abb. I) stellt die Zusammensetzung dieses fremden Materials dar, es handelt sich, wie in 3.2.2.1 erwähnt, um PEp C, E, F und Lysozym-reste. Diese Reste adsorbieren offenbar an den Layer. Die Affinität des HPI-Layers zum Murein entspricht nicht einer *in vivo* Situation. Es gibt keinen experimentellen Anlaßpunkt, der diese Möglichkeit unterstützen würde. Solche experimentell bedingten Affinitäten von Omp-Proteinen zu dem Murein wurden zuerst bei Poren-Proteinen von Enterobakterien, z.B. bei *Escherichia coli* mit Omp F (Rosenbusch, 1974) und Omp C (Hadegawa et al., 1976) beschrieben.

Zusammenfassung der Ergebnisse

- Zwei Polypeptide (PEp C und PEp E) sind als Murein-assoziierte Proteine anzusehen. Diese Bezeichnung wurde aus

reinen phänomenologischen Gründen gewählt, nämlich alle Proteine, die unter bestimmten Bedingungen (z.B. in 2 % SDS (w/v) bei 60°C) noch eine starke, aber nicht kovalente Bindung zum Murein unterhielten, wurde so bezeichnet (Lugtenberg und Van Alphen, 1983).

PEp C bleibt bis 40°C, und PEp E bleibt bis 100°C in Anwesenheit von SDS am Murein assoziiert. Diese Affinität wird durch die Tatsache, daß beide Polypeptide im Lysozymsolubilisat des Mureins zur Herstellung der Pink Envelope zu finden sind, unterstützt (siehe 3.1.3.6.1.2). Viel spricht dafür, daß für jedes dieser Proteine unterschiedliche Affinitäten zum Murein *in situ* vorhanden sein müßten, denn ein Teil dieser Proteine kann durch niedrige Solubilisierungstemperatur (ca. 25° - 30°C) mit SDS extrahiert werden.

- Der HPI-Layer assoziiert mit dem Murein unter diesen experimentellen Bedingungen. Die gewonnenen Murein-Sacculi sind zum Teil mit HPI-Layer bedeckt. Diese Assoziation findet wahrscheinlich in einer Adsorption nach der Solubilisierung ihren Ursprung und stellt nicht einen *in situ*-Zustand dar. Der Layer zeigt nach der Lysozym-Einwirkung und Verdauung des Mureins noch kontaminierendes Material aus PEp C, E, F und Lysozym.

3.2.3 Vernetzung der PEp-Proteine

Ziel der Vernetzungsstudien war es, Nachbarschaftsbeziehungen zwischen den PEp-Proteinen der Pink Envelope in der äußeren Membran, in dem Intercalating Material und zwischen der äußeren Membran und dem HPI-Layer-Protein aufzuklären. Die reversible Quervernetzungsanalyse bietet den Vorteil, daß sterische Beziehungen zwischen bestimmten Polypeptiden dargestellt werden können. Die experimentellen Bedingungen für Vernetzungsversuche mit DTSP sind in 2.9.2 vorgestellt worden.

3.2.3.1 Laterale Beziehungen der PEp-Proteine

3.2.3.1.1 Analyse von Vernetzungsprodukten in der ersten SDS-PAGE Dimension nach SDS-Solubilisierung (eindimensionale Vernetzungskarte)

Nach einer Vernetzung der Pink Envelope mit DTSP konnte der HPI-Layer mit den dazu vernetzten PEp-Proteinen gesondert isoliert werden (siehe 2.9.2.2). Die Proteine, die nicht mit dem HPI-Layer-Protein vernetzt wurden, wurden so getrennt untersucht. Die Tafel 33 (Abb. A bis C) faßt die Ergebnisse der Auftrennung von Vernetzungsprodukten in der ersten SDS-PAGE-Dimension zusammen. Die Abb. A zeigt eine Vernetzungsreihe mit Vernetzerkonzentrationen von 0.08 bis 6.25 mM DTSP. Schon bei der niedrigsten Konzentration treten Banden mit höheren apparenten Molekulargewichten, größer als 120 kD, auf. Mit zunehmenden Vernetzerkonzentrationen verschwinden einige Banden aus dem Bandenmuster der Pink Envelope. Auffällig sind vor allem drei Polypeptide, deren Färbungsintensitäten (sowohl im mit Coomassie- wie im Silber-gefärbten Gel) mit steigenden Vernetzerkonzentrationen abnehmen, während gleichzeitig Banden mit höheren apparenten Molekulargewichten zunehmen. Diese Beobachtung trifft für PEp A, PEp D (hm) (d.h. hitzemodifizierte Form, die nach einer Solubilisierungstemperatur in SDS-Lösung von 60°C vorwiegend besteht (siehe 3.2.1)) und PEp K zu. Dieses zuletzt genannte Polypeptid verschwindet vollständig aus dem Bandenmuster oberhalb einer DTSP-Konzentration von 2.08 mM. Von einer Konzentration von 0.23 mM DTSP an enthält das Elektropherogramm (siehe Abb. A in Tafel 33) nur noch PEp A, PEp D (hm), PEp G, H, I, J und K. PEp C, E und F sind nicht darstellbar und wahrscheinlich schon vernetzt. Die erhaltenen Vernetzungsprodukte, dargestellt oberhalb des PEp A-Polypeptids in der PAGE, reichen mit unterschiedlichen apparenten Molekulargewichten von 140 kD bis zu ca. 300 kD. Die empfindlichere Färbung mit Silber macht die Reaktionsprodukte der Vernetzung

deutlicher sichtbar als die Coomassie-Färbung (siehe Abb. A und Abb. B im Vergleich). Über die Zusammensetzung der Vernetzungsprodukte läßt sich aufgrund der Komplexität der Vernetzungsmuster keine Aussage treffen. Eine zweidimensionale Analyse, in Form einer zweidimensionalen Vernetzungskarte, war daher notwendig (siehe 2.3.1.2). Das eindimensionale Vernetzungsmuster liefert folgende Ergebnisse: PEp A, PEp D und PEp K können vernetzt werden, da ihre Färbungsintensität (beurteilt anhand von zwei unterschiedlichen Färbungstypen) im Gel mit steigender Vernetzerkonzentration abnimmt (siehe 2.9.2.4). Es stellt sich die Frage, ob die erzielten Vernetzungen der isolierten Pink Envelope nativen Strukturen in der intakten Zellwand des Bakteriums entsprechen. Die Vernetzungen konnten Produkte aus zufälligen Reorganisierungen der Pink Envelope darstellen. Diese Artefakte konnten während der Präparation der Pink Envelope entstanden sein. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Vergleich zwischen Vernetzungen mit Zellwänden (ohne Triton-Behandlung), Pink Envelope (präpariert aus Zellwänden ohne Triton-Behandlung) und Pink Envelope (gewonnen aus Zellwänden mit Triton-Behandlung) angestellt. Die Abb. C in Tafel 33 zeigt diesen Vergleich. Bezüglich des Bandenmusters in der SDS-PAGE konnten keine qualitativen Unterschiede festgestellt werden. Die Pink Envelope-Präparation ohne Entfernung der cytoplasmatischen Membrankontamination weist noch eine Kontamination an Lysozym auf, eine Bande mit dem MG app = 25 kD ist einem Polypeptid (Cmp 2) der cytoplasmatischen Membran zuzuordnen (siehe 3.1.3.1.3). Dieser Vergleich stützt die Annahme, daß die erhaltenen Vernetzungsprodukte native Strukturen einer intakten Zellwand darstellen.

Eine Spaltung des reversiblen Vernetzers nach einer Vernetzung der Pink Envelope liefert das gleiche Bandenmuster wie die unvernetzte Pink Envelope (siehe Abb. C in Tafel 33). Dies spricht für eine quantitative Reversibilität der Vernetzung. Weiterhin ist zu beachten, daß PEp C, G, H, I und J

vernetzt waren, da sie, wie schon vorher erwähnt, mit steigender Vernetzerkonzentration aus dem Pink Envelope-Bandenmuster in der PAGE verschwanden.

Die Kalibrierung von apparenten Molekulargewichten der Vernetzungsprodukte erfolgte in der ersten PAGE-Dimension mit bekannten Markerproteinen (siehe 2.7.5.1). Folgende Werte ergaben sich aus der Kalibrierung für die zusätzlichen Banden im Elektropherogramm: 86 kD, 150 kD, 180 kD, 240 kD bis 300 kD (siehe Tabelle 13).

3.2.3.1.2 Zweidimensionale Analyse von Vernetzungsprodukten der ersten PAGE-Dimension nach SDS-Solubilisierung (zweidimensionale Vernetzungskarte)

Die Elektrophorese der ersten Dimension lieferte das Ergebnis, daß mindestens drei zusätzliche Hauptbanden durch Vernetzung auftraten. Deren Zusammensetzungen konnten nicht identifiziert werden. Eine zweidimensionale Kartierung der Vernetzungskomponenten war folglich notwendig. Die zweidimensionale Vernetzungskarte der Pink Envelope-Proteine ist in Tafel 34, Abb. A dargestellt (zum Prinzip einer solchen Vernetzungskarte siehe 2.9.2.3; 2.9.2.4). Man erkennt unterhalb der Diagonalen im wesentlichen drei horizontale Reihen von Flecken (siehe auch die schematische Darstellung des Vernetzungsmusters der Polypeptide in Abb. 6 in 3.2.3.1.2). Diese Fleckenreihen sind, nach deren Mobilitäten in der zweiten Dimension der SDS-PAGE zu urteilen, PEp A, PEp D und PEp K zuzuordnen. Der Fleck A (2) stellt Komponenten des PEp A-Dimers dar. Das apparente Molekulargewicht des vernetzten Dimers in der ersten Dimension von 180 kD gleicht dem zu erwartenden theoretischen Wert von 240 kD nicht (ein PEp A-Monomer hat ein MG app = 120 kD). Die apparenten Molekulargewichte von vernetzten Polypeptiden in der SDS-PAGE zeigen häufig Abweichungen von der Summe der MG app-Werte der Komponenten (Peters und Richards, 1977; Ji, 1979).

Veränderungen der Stoke'schen Radien durch intra- oder intermolekulare Vernetzung führen zu erhöhten Mobilitäten und damit zu geringeren MG app-Werten. Die Anomalie des Wanderungsverhaltens des vernetzten PEp A-Polypeptids in der ersten SDS-PAGE beruht offenbar auf einer intramolekularen Vernetzung, die eine Versteifung der Struktur des Makromoleküls verursacht und diesem eine höhere Mobilität verleiht. Unterschiedliche intra- und intermolekulare Vernetzungsgrade von Dimeren bis zu höheren Oligomeren füllen die horizontale Fleckenlinie bei MG app = 120 kD unterhalb der Diagonale völlig auf (siehe Abb. A in Tafel 34 und das Schema in Abb. 6). Ein zweiter starker Fleck in dieser Reihe ist der Fleck A. Er zeigt eine vertikale Beziehung zu einem diffusen Fleck D in der darunter gelegenen horizontalen Fleckenlinie von PEp D. Die Flecken A und D sind dem Vernetzungsprodukt (mit dem MG app von 150 kD) in der ersten Dimension zuzuordnen (siehe Diagonale in Tafel 34, Abb. A und B). Diese Vernetzungsbande ist offenbar aus einer Vernetzung zwischen PEp A (MG app = 120 kD) und PEp D (MG app (hm) = 43 kD) gebildet worden. Möglicherweise bildet PEp A Trimere bis Oligomere, ein dicker Fleck mit dem MG app von ca. 240 kD ist am Anfang des Trenngels der ersten Dimension zu erkennen. Größere Aggregate dringen nicht in die Gelmatrix des Trenngels ein. Nach der rückgängig gemachten Vernetzung zu urteilen, bestehen diese Vernetzungsprodukte vorwiegend aus PEp A und PEp D (siehe die dicken lateralen verschmierten Banden am Anfang des zweidimensionalen Kartierungsgels in Tafel 34, Abb. A und B). Die horizontale Fleckenlinie von PEp D zeigt einen starken Fleck D (2), der dem Vernetzungsprodukt der ersten Dimension mit dem MG app = 86 kD zuzuordnen ist. Es handelt sich offenbar um ein Dimer aus PEp D (MG app des PEp D (hm)-Monomers = 43 kD). Weiterhin, wie schon für PEp A erwähnt, ist die vertikale Beziehung des Flecks von PEp D zu PEp A zu verzeichnen. Weitere Vernetzungszustände von PEp D und PEp A zu Trimeren und höheren Oligomeren einerseits und Hetero-

oligomeren (PEp D mit PEp A) andererseits,sind zu vermuten. Leider sind die Vernetzungskomponenten dieser Art im Trenngel der SDS-PAGE diffus und schlecht aufgetrennt. Eine mögliche Auftrennung zwischen Trimeren, Oligomeren dieser beiden zuletzt genannten Polypeptide ist durch die vermuteten Heterooligomeren zwischen PEp D und PEp A erschwert (siehe Abb. A und Abb. B in Tafel 34).

Die horizontalen Flecken, zugeordnet zu PEp K (MG app = 20 kD), sind als K (2) für eine Vernetzung von Dimeren und als K (3) für eine Vernetzung von Trimeren zu identifizieren. Positionen und Färbungsintensitäten dieser beiden Flecken (K (2), K (3)) deuten auf Vernetzungsprodukte hin. Der Fleck K (2) ist intensiver als K (3). Weitere Hinweise für das Vorhandensein von Oligomeren liegen nicht vor. Die Entdeckung dieser beiden Komponenten zu Vernetzungsbanden in der ersten Dimension konnten nur mit der empfindlichen Silberfärbung in der Diagonale sichtbar gemacht werden (siehe Abb. A in Tafel 34).

Der erste Fleck in der horizontalen Linie von PEp K-Komponenten unterhalb der Diagonale konnte nicht zugeordnet werden, da er dem Anschein nach in einer vertikalen Beziehung zu einem nicht identifizierten Polypeptid (mit einem MG app kleiner als PEp K) steht (und demnach vermutlich mit diesem vernetzt worden war).

Die Abb. B in der Tafel 34 zeigt eine zweidimensionale Vernetzungskarte, erzielt mit der Pink Envelope, isoliert aus der Mutante *Deinococcus radiodurans* Sark (HPI^-). Die Kartierung ergibt die gleichen Resultate wie für *Deinococcus radiodurans* Sark (HPI^+).

Dies deutet darauf hin, daß die *in situ* Anordnung der PEp-Proteine in einer Pink Envelope, die nur aus der äußeren Membran und dem Intercalating Material besteht, der einer Pink Envelope mit dem zusätzlichen S-Layer (HPI-Layer) entspricht. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die sterischen Wechselwirkungen dieser PEp-Proteine durch das Fehlen des HPI-Layers nicht beeinflußt werden (siehe 3.2.3.2).

Ein störender Effekt bei der zweidimensionalen Kartierung der mit SDS solubilisierenden Vernetzungsprodukte war das Auftreten von proteolytischen Fragmenten, vor allem von PEp A, trotz der Zugabe des Proteinase-Inhibitors PMSF (während des Versuches). Die proteolytischen Spaltprodukte PEp A pf_1, pf_2 und pf_3 sind vertikal unterhalb von PEp A in der Diagonale zu sehen (Abb. A und B). Diese Spaltprodukte treten natürlich auch unterhalb der Horizontalen von PEp A auf. PEp D zeigt ein leichtes Spaltprodukt bei einem apparenten Molekulargewicht von 40 kD. Die *in vitro* proteolysierten Proteine (wie PEp A und PEp D) werden offenbar durch DTSP intramolekular (vor allem PEp A) und intermolekular vernetzt. Dies hat zur Folge, daß die Spaltprodukte der proteolysierten Proteinmoleküle nach der 60°C-SDS-Behandlung der Pink Envelope nicht dissoziieren (aufgrund der intra- bzw. intermolekularen Vernetzungen) (siehe 3.2.1). Erst nachdem die Vernetzung rückgängig gemacht wurde, können solche durch Proteolyse betroffenen Moleküle in ihre proteolytischen Spaltprodukte zerfallen.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

- Drei PEp-Polypeptide wurden nach der Zusammensetzung der zweidimensionalen Kartierung von vernetzten Produkten des SDS solubilisierten Pink Envelope-Anteils als mögliche Vernetzungsprodukte identifiziert: PEp A, PEp D und PEp C.
- Die Polypeptide (PEp A und PEp D) bilden jeweils Dimere. PEp A und PEp D ergeben in der Vernetzungskarte eventuell Trimere und Oligomere. PEp K bildet Dimere und Trimere.
- PEp A und PEp D bilden Heterodimere und eventuell Heterooligomere untereinander. Diese Beobachtung deutet auf eine enge Nachbarschaft zwischen diesen beiden Proteinen hin.
- Kein Unterschied konnte zwischen Zellwänden (ohne Triton-Behandelung), Pink Envelope (gewonnen aus den gerade er-

wähnten Zellwänden) und Pink Envelope (präpariert aus Zellwänden mit Triton behandelt; siehe 2.4.2), festgestellt werden. Die mit dem Vernetzer DTSP aufgedeckten Nachbarschaften einiger PEp-Proteine könnten denen im intakten Bakterium entsprechen.

PEp-Polypeptid	Zuordnung der Vernetzungsprodukte und MG app in (kD)				
	Monomer	Dimer	Trimer	Oligomer	Heterooligomer (bzw.Heterodimer)
PEp A	120	180	n.d.	n.d.	150 (A + D)
PEp D(hm)	43	86	n.d.	n.d.	150 (A + D)
PEp K	20	40	55	-	-

Tabelle 13: Zusammenfassung der identifizierten vernetzten Multimere der PEp-Protein, isoliert mit einer 60°C - SDS - Solubilisierung der Pink Envelope und nach Studien der zweidimensionalen Vernetzungskarte (siehe Tafel 34 und Abb. 6). Die Ermittlung der apparenten Molekulargewichte,entstanden mit Hilfe von Marker-Proteinen (siehe Tafel 33, Abb. C).

n.d. = nicht ermittelt
- = nicht vorhanden

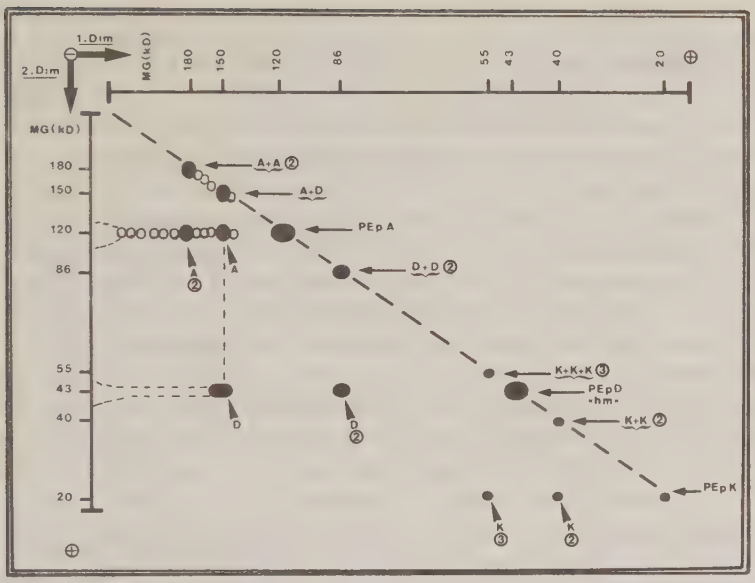


Abb. 6: Schematische Darstellung des Vernetzungsmusters der PEp-Polypeptide: PEp A, D, K, erhalten durch Vernetzung der isolierten Pink Envelope mit DTSP (0.69 mM). Die gestrichelten Linien unterhalb der Diagonale deuten auf laterales Schmieren von Polypeptiden (auch von nicht aufgetrennten). Die weißen Flecken stammten wahrscheinlich aus intramolekularen Vernetzungen des Polypeptids PEp A (in oligomeren und dimeren Formen). Die vertikal gestrichelte Linie deutet auf die vertikale Beziehung zwischen PEp A und PEp D im Vernetzungsmuster hin. Berücksichtigt wurden Daten der Silberfärbung (siehe Tafel 34, Abb. A und B).

3.2.3.2 Transversale Beziehung der PEp-Proteine zum HPI-Layer-Protein

Nach einer Vernetzung der Pink Envelope mit DTSP war es möglich, den HPI-Layer mit den an ihm vernetzten PEp-Proteinen von denen abzutrennen, die nicht mit dem Layer vernetzt waren (siehe auch 3.2.3.1). Die Isolierungsbedingungen für diesen Schritt sind in 2.9.2.2 besprochen worden. Die Resultate des Versuchs sind in der Tafel 35, Abb. A, B und C zusammengefaßt. Eine zweidimensionale Kartierung der Vernetzungsprodukte war in diesem Fall unmöglich, da einerseits das HPI-Layer-Protein als Layer vorlag und durch SDS unterhalb einer Temperatur von 80°C nicht denaturiert und solubilisiert wird (Karrenberg, 1981). Deshalb wurde die Vernetzung zuerst mit DTT im Reagenzglas rückgängig gemacht. Anschließend wurden die Proben in Anwesenheit von SDS bei 100°C behandelt, um den HPI-Layer zu solubilisieren (siehe 2.7.1.2.4). Anschließend wurden die Proben auf der SDS-PAGE analysiert. Abb. A in Tafel 34 zeigt die Resultate der Vernetzung von PEp-Proteinen mit dem HPI-Layer in Abhängigkeit von den Vernetzerkonzentrationen. Es ist ersichtlich, daß PEp A, PEp D und PEp K vor allem als stärkste Vernetzungsprodukte mit zunehmenden Vernetzerkonzentrationen an Färbungsintensität (mit den beiden PAG-Färbungstypen (siehe A und B in Tafel 34) zunehmen. Weiterhin gibt es einige zusätzliche Vernetzungsprodukte mit geringerer Ausbeute. In den Elektropherogrammen (siehe Tafel 35, Abb. A) war es schwierig, zwischen einigen PEp-Proteinen und proteolytischen Fragmenten des HPI-Layer-Proteins (z.b. wie PEp B pf_7 und pf_{11}) zu unterscheiden.Aufgrund dessen wurde der folgende Versuch durchgeführt: Die reversible Spaltung des Vernetzers mit DTT wurde vor der SDS-Dissoziation bei 100°C durchgeführt. So wurde der HPI-Layer von den vernetzten Proteinen abgetrennt und isoliert. Die beiden getrennten Komponenten wurden dann dissoziiert in SDS-Lösung bei 100°C (siehe 2.7.1.2.4) und anschließend analytisch auf der SDS-PAGE

untersucht. Das Resultat ist in Abb. C der Tafel 35 dargestellt. Eine weitgehend saubere Trennung wurde erzielt, eine leichte Kontamination an PEp B ist noch bei den vernetzten Komponenten sichtbar. Folgende zusätzliche PEp-Polyeptide wurden offenbar mit dem HPI-Layer vernetzt: PEp G, PEp H, PEp I. PEp C wurde auch vernetzt, allerdings ist eine Zunahme der Vernetzung mit steigenden Konzentrationen des Vernetzers nicht zu erkennen. Oberhalb einer Konzentration von 2.08 mM DTSP nimmt die Färbungsintensität des Polypeptids im Elektropherogramm ab. Dies trifft auch für PEp J zu. Die Bande wird oberhalb der gleichen Konzentration des Vernetzers wie bei PEp C diffus. Für die beiden Proteine kann keine Aussage getroffen werden. PEp C und PEp J können mit anderen PEp-Proteinen als dem des Layers mit niedrigen Vernetzerkonzentrationen vernetzt worden sein.

Zusammenfassung der Ergebnisse

- Sechs PEp-Polypeptide werden mit dem HPI-Layer-Protein vernetzt: PEp A, PEp D, PEp G, PEp H, PEp I und PEp K.

- PEp A ist mengenmäßig das stärkste und am häufigsten vernetzte PEp-Protein an dem HPI-Layer.

- Die Vernetzung von PEp A und PEp K und die damit verbundene Aussage über eine enge Nachbarschaftsbeziehung dieser beiden Proteine zum HPI-Layer wird durch das Ergebnis der HPI-Extraktion aus der Pink Envelope mit dem SDS-Detergens bei einer Solubilisierungstemperatur von 25°C bis 40°C für PEp A unterstrichen, wo PEp A als Kontamination sichtbar bleibt und von 25°C bis 30°C, wo PEp A als kontaminierendes Polypeptid noch vorhanden ist (siehe 3.2.1). Außerdem wird dieser Befund durch die Kontamination des HPI-Layers (isoliert aus ganzen Bakterienzellen mit LiDS bei 4°C) mit PEp A unterstützt (Rachel, 1982; Rachel et al., 1983).

- Alle diese Polypeptide müssen über vernetzbare Aminogruppen in ihren exponierten Bereichen an der Oberfläche verfügen, um mit der darüber liegenden unteren Seite des HPI-Layers vernetzen zu können (siehe 3.2.3.2.1).

3.2.3.2.1 Elektronenmikroskopische Darstellung der vernetzten PEp-Proteine an dem HPI-Layer und Vergleich mit Bedampfungen an der Pink Envelope

Eine wichtige Frage, die die durchgeführte Analyse von Vernetzungsprodukten mit der SDS-PAGE nicht beantworten konnte, war: auf welcher Seite des HPI-Layers sind die vernetzten PEp-Proteine verankert. Theoretisch wäre es möglich, daß sich einige PEp-Proteine oberhalb des HPI-Layers, d.h. in der Kohlenhydratkapsel befinden. Um diesen Aspekt zu klären, wurde eine elektronenmikroskopische Methode zur Analyse von Oberflächenstrukturen eingesetzt, die Metallbedampfung von gefriergetrockneten Proben mit Pt/C (siehe 2.10.4.2). Diese Methode erlaubt Beobachtungen von Details bis hinunter zur Korngröße des Aufdampfmaterials (ca 2 nm)(Wildhaber, 1983). Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tafel 36 dargestellt. Anhand der Bilder ist eindeutig sichtbar, daß die äußere Seite des HPI-Layers (d.h. die glatte Seite ("smooth side")) ohne Ausnahme frei von zusätzlichen Proteinen ist. Die innere Seite des Layers (d.h. die rauhe Seite ("rough side")) ist zum großen Teil mit Vernetzungsprodukten, vorwiegend Proteinen (siehe auch das Infrarot-Spektrum in Tafel 36, Abb. H), bedeckt. Diese Seite des Layers ist zur Membran gerichtet (Baumeister et al., 1981). Dies bedeutet, daß alle analytisch identifizierten vernetzten PEp-Polypeptide wie PEp A, D, G, H, I und K in der äußeren Membran offensichtlich gerichtet sind und daß sie, wie in 3.2.3.2 schon erwähnt, in Besitz von reagierbaren und sterisch günstig angeordneten Aminogruppen in ihren exponierten Bereichen an der Oberfläche sind.

Der HPI-Layer seinerseits besitzt offenbar Aminogruppen auf seiner rauhen Seite, die so sterisch günstig angeordnet sind,daß Vernetzungsreaktionen mit einigen darunterliegenden Membranproteinen eintreten können. Diese Bilder zeigen auch, daß eine Vernetzungsreaktion unter den durchgeführten Bedingungen (siehe 2.9.2.2) nicht quantitativ verläuft. Nicht alle Gitterplätze des Layers sind durch Vernetzungsprodukte besetzt. Dieser Umstand verhindert eine quantitative Massenbestimmung (in kD) der angelagerten Proteine pro Flächeneinheit des HPI-Layers mit Hilfe des STEM's (Engel, 1978; Engel et al., 1982). Diese STEM-Massen-Analyse *in situ* hätte zusätzlich eine Aussage über die Proteinmassenverteilung der Vernetzungsprodukte auf die Feinstruktur des HPI-Layer-Proteins (Core- und Spokes-Region; siehe auch 1.4) liefern können. Eine genaue Massenkartierung der Vernetzungsprodukte mit Berücksichtigung der Struktur des HPI-Layer-Proteins wäre somit möglich gewesen.

Die Tafel 37 zeigt Metallbedampfungen von isolierten Pink Envelopes aus Zellwänden,mit Triton behandelt. Nur die glatte Seite des HPI-Layers (d.h. die äußere Seite, Abb. A, B, C) ist ausschließlich auf der äußeren Seite der Pink Envelope zu sehen (eine maskierende Kohlenhydratkapsel ist nicht vorhanden (siehe auch 3.1.3.5.1)). Diese äußere Seite gleicht der des isolierten HPI-Layers (siehe Tafel 36, Abb. A bis D). Diese Beobachtung stützt die Aussage, daß sich *in situ* keine Proteine auf der Oberfläche des Bakteriums befinden (d.h. in der Kohlenhydratkapsel), die eine dauerhafte Nachbarschaft mit dem HPI-Layer einnehmen (siehe auch 3.1.1). Die Rosetten des HPI-Layers bei der Pink Envelope scheinen gefüllt zu sein.

Die Oberfläche der nackten äußeren Membran ist bei *Deinococcus radiodurans* R_1, aber vor allem bei *Deinococcus radiodurans* Sark (HPI^-) gut sichtbar (siehe Abb. A und D).

Sie erscheint in einer amorphen glatten Struktur. Den gleichen Befund zeigen entsprechende Bilder aus Pink Envelope (Sark (HPI^-)), isoliert aus Zellwänden ohne Triton-Behandlung (hier nicht gezeigt). Die äußere Membran scheint keine hochgeordneten Strukturen aufzuweisen. Die innere Seite des isolierten HPI-Layers mit den vernetzten PEp-Proteinen deutet auch nicht auf geordnete supramolekulare Strukturen dieser Proteine hin (siehe Tafel 36, Abb. C und D).

Das Infrarot-Spektrum des HPI-Layers ist ein reines Proteinspektrum (siehe Abb. G in Tafel 36), frei von Lipiden (keine sichtbare Bande bei 1730 cm^{-1}) und frei von Detergens (SDS). Die Bandenlagen des reinen HPI-Layer-Spektrums sind wie folgt: in der Amid I: Schulter bei 1680 - 1690 cm^{-1}, Maximum bei 1640 cm^{-1}; Amid II: breites Maximum bei 1525 cm^{-1}. Eine Bandenformanalyse im Bereich der Amid I-Region zur quantitativen Ermittlung der Sekundärstruktur des HPI-Layer-Proteins ergab einen Anteil von 23 % ß-Struktur (Baumeister et al., 1982). Eine derartige quantitative Untersuchung für das Spektrum des mit PEp-Proteinen vernetzten HPI-Layers (siehe Abb. H in Tafel 36) konnte aus zwei Gründen nicht gemacht werden: erstens ist es unvernünftig, Bandenformanalyse an einem Proteingemisch durchzuführen; zweitens ist es sehr wahrscheinlich, daß diese PEp-Proteine,vernetzt an dem HPI-Layer, durch die SDS-Behandlung denaturiert wurden. Dieses Spektrum erlaubt eine qualitative Aussage über die Zusammensetzung der untersuchten Probe. Es ist vorwiegend ein reines Proteinspektrum. Das Spektrum liefert keinen Hinweis auf die Kontamination der Probe mit Lipid- oder Zuckeranteil. Das Vorhandensein von eventuellen Mureinresten wird nicht anhand des Spektrums ersichtlich. Folglich wird die Bemerkung, daß die Innenseite des HPI-Layers mit Proteinen bedeckt ist, unterstützt.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

- Die elektronenmikroskopische Untersuchung des HPI-Layers mit den vernetzten PEp-Polypeptiden zeigt, daß diese Pro-

teine sich ausschließlich auf der inneren Seite des Layers befinden.

- Die äußere Seite des HPI-Layers weist keine vernetzten PEp-Proteine auf. Dieser Befund ist im Einklang mit Metallbedampfungsaufnahmen aus intaktem Pink Envelope, dort liegt die Oberfläche des Layers frei von zusätzlichen Proteinen.

- Zufällige Vernetzung zwischen Pink Envelope-Fladen während der Vernetzungsversuche traten anscheinend nicht auf (siehe 3.2.3.2.1 und Tafel 36).

- Die hier vorgestellten Bedampfungsbilder des HPI-Layers, begleitet von PEp-Proteinen (siehe Tafel 36), ähneln sehr denen, die eine kontaminierte HPI-Layer-Präparation (mit LiDS bei 4°C hergestellt) mit PEp A ergaben (Rachel, 1982). Dort lag das kontaminierende PEp A-Protein ausschließlich auf der Innenseite des Layers.

3.2.4 Detergensextraktionen an ganzen Bakterien und Pink Envelope

Zur Erweiterung des topographischen Studiums der PEp-Proteine der äußeren Zellwand wurden die Extraktionen von Membranproteinen mit Hilfe von milden Detergenzien durchgeführt. Die Ziele solcher Experimente waren:

a) Extraktionen der Membranproteine unter milden Bedingungen mit und ohne begleitende Ionen. Ein Protein sollte durch sein Verhalten gegenüber der Extraktion näher charakterisiert werden.

b) Die Beziehungen der Membranproteine zum HPI-Layer in der Zellwand sollten untersucht werden, indem die unsolubilisierbaren Bestandteile mit dem HPI-Layer, erhalten nach den Detergens-Extraktionen, in der SDS-PAGE analysiert wurden.

c) Die morphologischen Auswirkungen der Detergenseinwirkung in der Zellwand sollten anhand von Ultradünnschnittuntersuchungen an ganzen Bakterienzellen dargestellt werden.

d) Der Hydrophobizitätscharakter der jeweiligen PEp-Proteine sollte durch Detergenskondensationsexperimente nach einer Detergens-Extraktion dargestellt werden. Dazu diente das Detergens Triton X-114. Diese Versuche sollten eine Aussage zu dem intrinsischen oder peripheren Charakter der Membranproteine liefern.

3.2.4.1 Detergensextraktionen mit dem Detergens MEGA-10

3.2.4.1.1 An ganzen Bakterienzellen

Die Resultate dieser Experimente sind in der Tafel 38 zusammengestellt. Die Tabelle 14 faßt die Ergebnisse der Detergensextraktionen anhand der SDS-PAGE-Analyse (Tafel 38, Abb. D und E) tabellarisch zusammen.

Die Detergens-Extraktionen an ganzen Bakterienzellen verursachen eine Delipidation der Membranen. Als Beweis dient der elektronenmikroskopische Befund über das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein der Membrandoppellinie der cytoplasmatischen und äußeren Membran. Die Abb. B in Tafel 38 zeigt, daß sowohl die cytoplasmatische als auch die äußere Membran ihre Doppellinie verloren haben. Folgende morphologischen Veränderungen werden in der Zellwand festgestellt:

a) Die Kohlenhydratkapsel ist vollständig extrahiert worden.

b) Das Intercalating Material wirkt stark aufgelöst. Fadenartige Strukturen überspannen die Distanz zwischen äußerer Membran und Murein.

c) Die äußere Membran weist nur noch eine Linie auf.

Diese elektronenmikroskopischen Befunde gelten für alle Extraktionen, die mit diesem Detergens durchgeführt wurden. Die Elektropherogramme für die drei unterschiedlichen Extraktionsvarianten weisen starke Unterschiede auf (siehe Tafel 38, Abb. D und Tabelle 14). Anhand der Mobilitäten in der SDS-PAGE können die solubilisierten Polypeptide aus den ganzen Bakterien mit denen der PEp-Proteine identifiziert werden. Der Zusatz von Begleitionen (in Form von $CuCl_2$ und NaCl) zeigt eindeutig eine gezielte und damit bevorzugte Extraktion von PEp C mit den zugehörigen proteolytischen Fragmenten sowie PEp F, H und J. Der Zusatz von NaCl bestätigt diesen Befund für PEp C, PEp F, H und J. Die hohe Ionenstärke (Begleitionen NaCl) steigert die Extraktionseffizienz. PEp A und D werden zusätzlich solubilisiert. Der Verzicht auf Begleitionen führt lediglich zu einer Solubilisierung von PEp A, D und vermutlich J.

3.2.4.1.2 An der Pink Envelope

Die Elektropherogramme der Abb. E in der Tafel 38 zeigen für die unterschiedlichen Extraktionsexperimente Resultate, die weitgehend denen der ganzen Bakterien ähneln (siehe Tabelle 14). Das Detergens MEGA-10 allein solubilisiert vorwiegend PEp A und PEp D, spurenweise PEp B, PEp C, PEp D, PEp G und PEp J. Der Zusatz an Begleitionen wie $CuCl_2$ (15 mM) zum Detergens solubilisiert gezielt PEp C (mit seinen proteolytischen Fragmenten, wobei PEp C pf_1 am stärksten extrahiert wird), PEp F und PEp J. Lysozym wird quantitativ aus der Pink Envelope entfernt (siehe auch 3.1.3.6.1.2). Der Zusatz an NaCl (100 mM) zeigt für Lysozym das gleiche Resultat. Die Solubilisierung wird verstärkt gegenüber $CuCl_2$, und folgende PEp-Polypeptide werden zusätzlich extrahiert: PEp A, PEp D, PEp E, PEp F und PEp J. Das Pellet, das am Ende einer dreifachen sukzessiven Detergens-Extraktion der Pink Envelope mit Begleitionen (z.B. in Form von NaCl) entstanden ist (siehe Tafel 38, Abb. E), zeigt das

Banden-bezeichnung	Ganze Bakterien			Pink Envelope		
	Detergens: MEGA-10, Solubilisierungstemperatur (30°C)					
	purum	+ $CuCl_2$ (15 mM)	+ NaCl (100 mM)	purum	+ $CuCl_2$ (15 mM)	+ NaCl (100 mM)
PEp A	+	-	+	+	-	+
PEp B	-	-	-	+	-	-
PEp A pf 3	+	-	+	+	-	+
PEp C	-	++	++	+	+	+
PEp C pf 1	-	++	++	+	++	++
PEp D	+	-	+	+	-	+
PEp E	-	-	-	-	-	+
PEp F	-	++	++	-	+	+
PEp G	-	-	-	+	-	+
PEp H	-	+	+	-	-	-
PEp I	-	-	-	-	-	-
PEp J	+	+	+	+	+	+
PEp K	-	-	-	-	-	-
Lysozym	-	-	-	-	++	++

Tabelle 14: Zusammenfassung der Extraktionsprodukte an ganzen Bakterien (GB) und Pink Envelope (PE) mit dem Detergens MEGA-10 (Solubilisierungstemperatur 30°C). Das Vorkommen eines PEp-Polypeptids wurde entnommen aus den Elektropherogrammen in Tafel 38, Abb. D und E.
++: stark vorhanden, +: vorhanden, -: nicht vorhanden; beschrieben anhand der Färbungsintensität der Bande im PAG.

HPI-Layer-Polypeptid PEp B, begleitet vorwiegend von PEp A, PEp C, PEp D und PEp K. Dieses Bild weist auf die starken Protein-Protein-Interaktionen hin, die zwischen dem Layer und diesen Proteinen existieren. Der gesamte Protein-Komplex

bleibt unter diesen experimentellen Bedingungen mit MEGA-10 unsolubilisierbar. Eine Aufnahme einer Bedampfung eines solchen Pelletbestandteils zeigt die Abb C in Tafel 38. Die HPI-Layer-Oberfläche liegt nackt vor, unterhalb des Layers drükken sich Aggregate (vermutlich PEp-Proteine) durch und erzeugen Unebenheiten (zum Vergleich siehe Tafel 37, Abb. B und C aus 3.2.3.2.1).

Die solubilisierten Proteine aus der Pink Envelope,erhalten durch Detergens-Extraktion mit Begleitionen, nachträglich versetzt mit SDS bei 25°C, weisen keine Aggregatbildungen mit höheren apparenten Molekulargewichten wie z.B. PEp C, PEp E, PEp J - außer für PEp A - auf.

3.2.4.2 Detergensextraktionen mit dem Detergens Triton X-114

3,2,4,2,1 An ganzen Bakterienzellen

Die Resultate dieser Experimente sind in Tafel 39 und Tabelle 15 zusammengefaßt.

Die morphologischen Auswirkungen der Detergens-Extraktion werden in den Abb. B, C und D der Tafel 39 sichtbar. Eine Delipidation der cytoplasmatischen und der äußeren Membran ist generell erreicht worden. Eine Ausnahme macht die Probe, die mit den Begleitionen $CuCl_2$ (15 mM) behandelt wurde, die Doppellinien von cytoplasmatischer und äußerer Membran sind teilweise noch erhalten. Folgende weitere morphologische Veränderungen sind gegenüber einer intakten Zellwand noch zu verzeichnen:

a) Die Kohlenhydratkapsel wird mit Hilfe des Detergens entweder vollständig extrahiert oder teilweise stark reduziert bei Zusatz von Begleitionen.

b) Das Intercalating Material wird aufgelockert, Bestandteile werden herausgelöst, fadenartige Strukturen persi-

stieren und überspannen die Distanz zwischen der äußeren Membran und Murein.

c) Wenn die äußere Membran ihre Doppellinienstruktur verliert, bleibt eine dunkle Linie zurück.

d) Die hohe Ionenstärke bei z.B. NaCl (siehe Tafel 39, Abb. D) bewirkt eine Entmischung des Zellinhalts.

Die Elektropherogramme zeigen unterschiedliche Resultate bei den jeweiligen Extraktionsvarianten (siehe Tafel 39, Abb. E und Tabelle 15).

Anhand der Mobilitäten der einzelnen Polypeptide in der SDS-PAGE können einige als Bestandteile der Zellwand identifiziert werden (siehe auch 3.2.4.2.2). Der Zusatz an Begleitionen in Form von $CuCl_2$ (15 mM) und NaCl (100 mM) bewirkt eine gezielte Extraktion der Polypeptide PEp C (mit PEp C pf_1) und PEp F. Außerdem werden mit $CuCl_2$ PEp A und PEp D spurenweise solubilisiert. Die höhere Konzentration an NaCl (100 mM) bewirkt eine verstärkte Solubilisierung von PEp A, PEp D, PEp G und PEp J. Dagegen bewirkt der Einsatz von Detergens allein vorwiegend die Isolierung von PEp A, PEp D und PEp J.

3.2.4.2.2 An der Pink Envelope

Die Elektropherogramme in der Abb. F der Tafel 39 zeigen die verschiedenen Resultate, die weitgehend mit denen an ganzen Bakterien erzielten übereinstimmen. Das Detergens allein solubilisiert vorwiegend PEp A, PEp D und PEp K sowie schwächer PEp F, PEp G und PEp J. Die Begleitionen in Form von $CuCl_2$ (15 mM) erlauben eine bevorzugte Extraktion von PEp C (mit PEp C pf_1 und pf_2, wobei diese proteolytischen Fragmente eher isoliert werden), weiterhin PEp A und in geringerem Maße PEp F. Lysozym wird aus der Pink Envelope

extrahiert. Mit den Begleitionen NaCl (100 mM) wurden nahezu identische Resultate für PEp C und PEp F erzielt. PEp A, PEp D, PEp J und PEp K sowie Lysozym werden mit dieser Ionenstärke mit hoher Effizienz isoliert.

3.2.4.2.3 Kondensationsexperimente mit Triton X-114

Der Vorteil dieses Detergens ist die Fähigkeit zur Kondensation bei einer Temperatur oberhalb von 22°C. Eine Phasentrennung findet statt in zwei Phasen: eine hydrophobe Phase (detergensreiche Phase) und eine hydrophile Phase (wässerige Phase) (siehe auch 2.9.1.3.2). Hydrophile und hydrophobe Extraktionsprodukte werden entsprechend fraktioniert. Die Trennung erlaubt eine Aussage über den Membranproteincharakter eines Proteins, z.B. als integrales oder peripheres Membranprotein (Bordier, 1982). Diese Versuche zeigten für einige PEp-Proteine folgende bevorzugte Löslichkeit (siehe Tabelle 16 und Tafel 39, Abb. F) in den jeweiligen Phasen.

Die Aussagen über den Hydrophobizitätscharakter beziehen sich nicht unbedingt auf das Protein als Monomer , sondern vielmehr, wenn es *in situ* als Aggregate (z.B. dimer, trimer etc.) vorliegt, auf diesen Aggregationszustand. Dies ist der Fall für PEp A, PEp D und PEp K, die in der äußeren Membran z.B. in dimerer Form vorzufinden sind (siehe 3.2.3.1.2) und möglicherweise bei einer schonenden Extraktion (z.B. ohne SDS-Zugabe) in dieser Form isoliert werden. Demnach würden die Aggregate anhand ihres Hydrophobizitätscharakters während der Kondensation bevorzugt in einer der Phasen sich lösen, um nach der Dissoziation mit SDS in ihre Komponenten zu zerfallen.

Lysozym komplexiert *in vitro* vermutlich mit PEp C und/oder mit PEp F. Das Enzym ist bei einer Detergens-Extraktion mit Begleitionen in der detergensreichen Phase vorzufinden.

Banden-bezeichnung	Ganze Bakterien						Pink Envelope					
	Detergens: Triton X-114, Solubilisierungstemperatur (ca 0°C)											
	purum		+ $CuCl_2$ (15 mM)		+ NaCl (100 mM)		purum		+ $CuCl_2$ (15 mM)		+ NaCl (100 mM)	
	DP	wP	DP	wP	DP	wP	DP	wP	DP	wP	DP	wP
PEp A	+	-	+/-	-	+	-	++	-	+	-	++	-
PEp B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEp A pf 3	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+	-	-	-	+	-
PEp C	-	-	+	++	+	++	-	-	+/-	+/-	+	+
PEp C pf 1	-	-	+/-	+	+/-	+	-	-	+	+	+	+
PEp D	+	+	+/-	-	+	+	++	+/-	-	-	++	+/-
PEp E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEp F	-	-	+/-	+	+/-	+	+/-	-	+/-	-	+	+
PEp G	-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	-	+	+
PEp H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEp I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEp J	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
PEp K	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	+	-
Lysozym	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+

Tabelle 15: Zusammenfassung der Extraktionsprodukte aus ganzen Bakterienzellen (GB) und Pink Envelope (PE) mit dem Detergens Triton X-114 (Solubilisierungstemperatur ca. 0°C). Die Kondensationsphasen des Detergens bei 30°C sind: Detergensphase (DP) und wässerige Phase (wP). Das Vorkommen eines Polypeptids wurde entnommen aus den Elektropherogrammen in Tafel 39, Abb. E und F.
++: Stark vorhanden, +: vorhanden, +/-: schwach vorhanden, -: nicht vorhanden;
beschrieben anhand der Färbungsintensität der Bande im PAG.

Ein Kontrollversuch mit Lysozym allein zeigte, daß dieses Protein sich in geringerem Maß in dieser Phase löst. Es sei daran erinnert, daß Lysozym über hydrophobe Regionen verfügt, die diese geringe Löslichkeit erklären können (Shaltiel, 1984).

PEp-Polypeptid	Löslichkeitsverhalten während der Detergenskondensation	Hydrophobizitätscharakter anhand der Löslichkeit	mögliche Klassifizierung als Membranprotein
PEp A	DP	hydrophob	intrinsisch
PEp B	-	-	-
PEp C	DP + wP	teils hydrophob, teils hydrophil	peripher
PEp D	DP + (wP)	mehr hydrophob als hydrophil	intrinsisch
PEp E	-	-	-
PEp F	(DP) + wP	mehr hydrophil als hydrophob	peripher
PEp G	DP + wP	teils hydrophob, teils hydrophil	peripher
PEp H	-	-	-
PEp I	-	-	-
PEp J	DP	hydrophob	intrinsisch
PEp K	DP	hydrophob	intrinsisch

Tabelle 16: Zusammengefaßte Resultate von einigen PEp-Proteinen anhand ihres Löslichkeitsverhaltens bei der Kondensation des Detergens Triton X-114 und ihrer möglichen Klassifizierung als Membranproteine. DP = Detergensphase; wP = wässerige Phase. Für die mit dem (-)-Zeichen gekennzeichneten PEp-Polypeptide konnte keine Aussage getroffen werden. Diese Nebenproteine konnten in der SDS-PAGE nicht ermittelt werden. PEp B (das HPI-Layer-Protein) war mit Triton X-114 nicht solubilisierbar.

3.2.4.3 Detergensextraktionen mit dem Detergens LDAO

3.2.4.3.1 An ganzen Bakterienzellen

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tafel 40 und Tabelle 17 zusammengefaßt.

Die morphologischen Veränderungen der Zellwand, verursacht durch die Detergens-Extraktion, sind in der Tafel 40, Abb. B, C und D dargestellt. Die Delipidation der cytoplasmatischen Membran ist bei allen drei Extraktionstypen vollständig erreicht. Die charakteristische Doppellinie der cytoplasmatischen Membran ist nicht mehr vorhanden. Folgende zusätzliche morphologische Veränderungen gegenüber der intakten Zellwand sind erwähnenswert:

a) Die Kohlenhydratkapsel wurde vollständig mit dem Detergens extrahiert. Mit dem Zusatz von Begleitionen wird die Kohlenhydratkapsel weitgehend entfernt, aber einige Reste bleiben noch vorhanden.

b) Die äußere Membran behält noch teilweise, vor allem bei den Proben, die zusätzlich mit Begleitionen behandelt wurden, ihre doppellinige Struktur.

c) Das Intercalating Material wirkt aufgelockert, Substanzen sind herausgelöst worden. Fadenartige Strukturen bleiben zurück und füllen die Zone zwischen äußerer Membran und Murein.

d) Die Extraktion mit diesem Detergens bewirkt offenbar allgemein ein Entmischen des Zellinhaltes.

Die Elektropherogramme zeigen unterschiedliche Extraktionsergebnisse zwischen den verschiedenen Solubilisierungsvarianten (siehe Tafel 40, Abb. E und Tabelle 17). PEp A und PEp D werden bevorzugt aus der Zellwand mit dem Detergens allein extrahiert. Der Zusatz von Begleitionen

erlaubt mit $CuCl_2$ (15 mM) eine bevorzugte Isolierung von PEp C (mit PEp C pf_1 und pf_2) und PEp F. Außerdem werden PEp D, PEp G, PEp H und PEp J im Bandenmuster beobachtet. PEp D liegt offenbar als Aggregat vor, das Polypeptid wird nur bei einer Dissoziationstemperatur von 100°C in der SDS-PAGE sichtbar. Mit NaCl (100 mM) als Additiv zum Detergens werden die gleichen Proteine wie mit $CuCl_2$ bevorzugt isoliert: PEp C (mit PEp C pf_1 und pf_2), PEp F sowie in geringerem Maße PEp G und PE p J. Die Solubilisierungseffiziens wird durch die höhere Ionenstärke gesteigert und PEp A, PEp D erscheinen im Bandenmuster. Bei niedriger Dissoziationstemperatur (25°C) liegen folgende PEp-Proteine vermutlich als Aggregate vor: PEp A, PEp D, PEp C. Diese Polypeptide erscheinen in verstärktem Maß im Bandenmuster ab einer Dissozationstemperatur von z.B. hier 100°C in Anwesenheit von SDS.

3.2.4.3.2 An der Pink Envelope

Die Elektropherogramme der Abb. F in Tafel 40 zeigen die Resultate der Extraktionen an der Pink Envelope. Das Detergens allein solubilisiert PEp A, PEp D und in einer schwächeren Weise PEp C (mit PEp C pf_1). Lysozym wird aus der Pink Envelope extrahiert. Der Zusatz von Begleitionen in Form von $CuCl_2$ (15 mM) zeigt, daß PEp C (mit PEp C pf_1 als predominierend), PEp D, PEp F, PEp G und PEp J sowie PEp A (spurenweise) solubilisiert werden. Lysozym wird quantitativ aus der Pink Envelope entfernt (siehe das Bandenmuster des Pellets in Abb. F der Tafel 40). Das Pellet aus einer Pink Envelope, gewonnen nach einer dreifachen Detergens-Extraktion mit NaCl (100 mM) als Additiv, zeigt, daß vorwiegend PEp A, PEp C, PEp D, PEp K den HPI-Layer-Polypeptid (PEp B) im Bandenmuster begleiten. Dieser Befund weist auf die starken Protein-Protein-Wechselwirkungen hin, die zwischen dem Layer und diesen Proteinen existieren (siehe auch 3.2.3.2).

Der gesamte Protein-Komplex bleibt unter diesen experimentellen Bedingungen mit LDAO unsolubilisierbar. Außerdem ist das schwächere Vorhandensein einiger zusätzlicher PEp-Proteine wie PEp E, PEp F, PEp G, PEp H und PEp I im Elektropherogramm zu erwähnen. Bei niedriger Dissoziationstemperatur mit SDS (25°C) liegen PEp A und PEp D vermutlich als Aggregate vor (siehe Tafel 50, Abb. F: Extraktion der Pink Envelope nur mit dem Detergens LDAO).Die Resultate, erzielt mit der Pink Envelope, ähneln sehr denen, die mit ganzen Bakterien erreicht wurden.

Banden-bezeich-nung	ganze Bakterien			Pink Envelope		
	Detergens LDAO; Solubilisierungstemperatur 30°C					
	purum	+ $CuCl_2$ (15 mM)	+ NaCl (100 mM)	purum	+ $CuCl_2$ (15 mM)	+ NaCl (100 mM)
PEp A	+	-	+	++	+/-	++
PEp B	-	-	-	-	-	-
PEp A pf_3	-	-	+/-	+	-	+
PEp C	-	++	++	+/-	+/-	+/-
PEp C pf_1	-	+	+	+/-	++	++
PEp D	+	+	++	++	+	++
PEp E	-	-	-	+/-	-	+
PEp F	-	++	++	+/-	+	+
PEp G	-	+	+	+/-	+/-	+
PEp H	-	+	-	-	-	+/-
PEp I	-	-	-	-	-	-
PEp J	-	+	+	-	+	+
PEp K	-	-	-	-	-	+/-
Lysozym	-	-	-	++	++	++

Tabelle 17: Zusammenfassung des Extraktionsprodukte aus ganzen Bakterienzellen (GB) und Pink Envelope (PE) mit dem Detergens LDAO (Solubilisierungstemperatur 30°C). Das Vorkommen eines Polypeptids wurde aus den Elektropherogrammen in Tafel 40, Abb. E und F entnommen.
++: stark vorhanden; +: vorhanden; +/-: kaum vorhanden;
-: nicht vorhanden; beschrieben anhand der Färbungsintensität der Bande im PAG.

3.2.4.4 Detergensextraktionen mit dem Detergens SB-12

3.2.4.4.1 An ganzen Bakterienzellen

Die Resultate dieser Versuche sind in Tafel 41 und Tabelle 18 zusammengetragen.

Die morphologischen Veränderungen in der Zellwand durch Einwirkung des Detergens mit oder ohne Begleitionen sind in Abb. B, C und D der Tafel 41 zu sehen. Die Delipidation der cytoplasmatischen Membran ist vollständig, ihre Doppelstruktur ist nicht mehr vorhanden. Die zusätzlichen wesentlichen morphologischen Eingriffe in der Zellwand durch die Extraktionsbedingungen im Vergleich zur intakten Zellwand sind wie folgt:

a) Die Kohlenhydratkapsel wurde stark reduziert.

b) Die äußere Membran behält noch teilweise ihre doppellinige Struktur.

c) Das Intercalating Material ist zum Teil aufgelöst worden und wirkt aufgelockert. Fadenartige Strukturen verbinden äußere Membran und Murein.

d) Die Extraktionen mit dem Detergens sorgen für eine Entmischung des Zellinhalts.

Die Elektropherogramme (siehe Tafel 41, Abb. E) zeigen die Auftrennung der verschiedenen Solubilisate. Der Vergleich der Mobilitäten der extrahierten Polypeptide mit denen der Pink Envelope erlaubt die Identifikation der Zellwandproteine. Das Detergens allein ist in der Lage, PEp A, PEp D vorzugsweise aus der Zellwand von ganzen Bakterienzellen zu isolieren. Der Zusatz von $CuCl_2$ (15 mM) zum Detergens bewirkt, daß PEp C (mit PEp C pf_1), PEp F bevorzugt isoliert werden. In geringerer Stärke werden noch PEp D und PEp J extrahiert. Das Bild für die Kombination des Detergens mit

NaCl (100 mM) ähnelt dem von $CuCl_2$ insofern, als PEp C (mit PEp C pf_1), PEp F am stärksten solubilisiert werden, hinzu kommen PEp A, PEp D sowie PEp G und PEp J (spurenweise). Bei niedriger Dissoziationstemperatur (25°C) mit SDS liegen PEp A, PEp C, PEp D offensichtlich als Aggregate vor, die bei 100°C in ihre Bestandteile dissoziiert werden.

3.2.4.4.2 An die Pink Envelope

Die Resultate sind in den Elektropherogrammen der Abb. F in Tafel 41 dargestellt und der Tabelle 18 zusammengetragen. Das Detergens allein solubilisiert fast ausschließlich PEp A und PEp D. Spurenweise wird auch Lysozym aus der Envelope extrahiert. Der Zusatz von Begleitionen für die Extraktion, z.B. in Form von $CuCl_2$ (15 mM), erlaubt die gezielte Solubilisierung von PEp C (mit PEp C pf_1; das proteolytische Spaltfragment wird bevorzugt solubilisiert), PEp D, PEp J sowie PEp F und PEp G. Lysozym wird quantitativ aus der Pink Envelope extrahiert. Das Pellet, erzielt nach einer dreifachen Detergens-Behandlung der Probe, zeigt die quantitative Entfernung des Enzyms. Bemerkenswert an dem Pellet ist, daß mit dem HPI-Layer-Polypeptid PEp B, PEp A, PEp C, PEp K noch weitgehend quantitativ in dem Bandenmuster der SDS-PAGE vorliegen. PEp E, PEp G, PEp H und PEp I sind noch im Bandenmuster des Pellets sichtbar. Mit den Begleitionen NaCl (100 mM) ist die Effizienz der Detergensextraktion verstärkt. PEp A, PEp C (vor allem PEp C pf_1), PEp D, PEp J werden bevorzugtisoliert. Weiterhin werden PEp E, PEp F, PEp G aus der Pink Envelope entfernt. Lysozym wird wie mit $CuCl_2$ quantitativ aus der Probe extrahiert. Das Pellet, gewonnen nach einer dreifachen Detergens-Behandlung der Pink Envelope, zeigt, daß PEp A, PEp D, PEp C und PEp K noch stark mit dem HPI-Layer in Wechselwirkung stehen. Diese Polypeptide begleiten noch das HPI-Layer-Protein im Elektropherogramm (Tafel 41, Abb. F). Bei niedriger Dissoziationstemperatur mit SDS (25°C) liegen PEp A, PEp D und PEp C als

mögliche Aggregate mit höheren apparenten Molekulargewichten vor. Sie zerfallen erst durch die Dissoziationstemperatur von 100°C in Anwesenheit von SDS in ihre Bestandteile. Diese Beobachtungen stützen sich einerseits auf die verstärkte Färbungsintensität dieser Poylpeptide im Bandenmuster nach der Dissoziation mit SDS bei 100°C und andererseits auf die Abwesenheit dieser Polypeptide in der SDS-PAGE nach der Dissoziationstemperatur von 25°C.

Banden-bezeichnung	Ganze Bakterien			Pink Envelope		
	Detergens: SB-12; Solubilisierungstemperatur 30°C					
	purum	+ $CuCl_2$ (15 mM)	+ NaCl (100 mM)	purum	+ $CuCl_2$ (15 mM)	+ NaCl (100 mM)
PEp A	+	-	+	++	-	++
PEp B	-	-	-	-	-	-
PEp A pf_3	+/-	-	+/-	+	-	+
PEp C	-	++	++	-	+	+
PEp C pf_1	-	+	+	-	++	++
PEp D	+	+/-	+	++	+	+
PEp E	-	-	-	-	-	-
PEp F	-	++	++	-	+	+
PEp G	-	++	++	-	+	+
PEp H	-	-	-	-	-	-
PEp I	-	-	-	-	-	-
PEp J	+	+	+	-	++	++
PEp K	-	-	-	-	-	+/-
Lysozym	-	-	-	+	++	++

Tabelle 18: Zusammenfassung der Extraktionsprodukte ganzer Bakterienzellen (GB) und Pink Envelope (PE) mit dem Detergens SB-12 (Solubilisierungstemperatur 30°C). Das Vorkommen eines Polypeptids wurde aus den Elektropherogrammen der Tafel 41, Abb. E und F entnommen.
++: stark vorhanden; +: vorhanden; +/-: kaum vorhanden;
-: nicht vorhanden, beschrieben anhand der Färbungsintensität der Banden im Gel.

3.2.4.5 Allgemeine Zusammenfassung über die Detergens-extraktionen an ganzen Bakterien und Pink Envelope

Die Detergensextraktionen an ganzen Bakterien zeigen, daß PEp-Proteine aus den Zellwänden isoliert werden. Der Vergleich der ganzen Bakterien und Pink Envelope-Extraktionen anhand des Bandenmusters in der SDS-PAGE bestätigt diese Aussage. Elektronenmikroskopisch (anhand von Ultradünnschnitten) konnte gezeigt werden, daß bei den Extraktionen an ganzen Bakterien drastische morphologische Veränderungen in der Zellwand eintreten. Die am stärksten betroffenen Bereiche sind: die Kohlenhydrakapsel, die extrahiert wird; die äußere Membran verliert zum Teil ihre Doppellinie und wird zu einer Linie reduziert; das Intercalating Material wird weitgehend extrahiert und wirkt morphologisch aufgelockert, fadenartige Strukturen bleiben zurück und spannen die Distanz zwischen äußerer Membran und Murein.

- Die Detergenssolubilisierung der ganzen Bakterien und Pink Envelope mit Begleitionen(in Form von $CuCl_2$, NaCl) und unterschiedliche Ionenstärke erlaubt bevorzugte Extraktionen von einigen PEp-Proteinen. Eindeutig wird die Isolierung von PEp C, PEp F (beide Murein-assoziierte Proteine (siehe 3.2.2)) mit Begleitionen gefördert. Die niedrige Ionenstärke, wie z.B. bei $CuCl_2$ (15 mM), erhöht die Selektivität der Extraktion bezüglich PEp C und PEp F. Lysozym wurde in diesen Versuchen durch den Einsatz von Begleitionen quantitativ aus der Pink Envelope extrahiert. Das Enzym begleitet ohne Ausnahme PEp C und PEp F in den Bandenmustern der Solubilisate in der SDS-PAGE (siehe auch 3.1.3.6.1.2 und 3.2.2). Diese Beobachtung deutet auf die Lokalisierung der beiden zuletzt genannten PEp-Proteine im Intercalating Material. Die morphologische Auflockerung des Intercalating Materials nach Einwirkung von Detergenzien unterstreicht diese Deutung.

- Die simultane Isolierung von PEp A und PEp D kann mit Detergens allein oder mit hoher Ionenstärke und Begleitionen erreicht werden. Die Resultate, erzielt mit unterschiedlichen Dissoziationstemperaturen (25°C, 100°C) in Anwesenheit von SDS, geben den starken Hinweis, daß diese beiden Proteine in Aggregaten aus der Zellwand extrahiert werden. Sie sind bei niedriger Dissoziationstemperatur (25°C) mit SDS in den Bandenmustern der SDS-PAGE schwach sichtbar und werden erst bei einer Dissoziationstemperatur von 100°C sichtbar (siehe auch 3.2.3).

- PEp G und PEp J werden effizienter mit Detergens und mit Begleitionen aus der Pink Envelope extrahiert.

- Das HPI-Layer-Protein wird von keinem der eingesetzten Detergenzien und Extraktionsvariationen (mit oder ohne Begleitionen) aus der Zellwand extrahiert. Bemerkenswert sind die stabilen Protein-Protein-Interaktionen (trotz Delipidation der äußeren Membran), die zwischen einigen PEp-Proteinen und dem Layer bestehen, wie PEp A, PEp D und PEp K (siehe auch 3.2.3.2). Das PEp C-Protein in seiner unproteolysierten Form läßt sich nicht quantitativ aus dem (PEp-Protein-/HPI-Layer-)Komplex isolieren. Vermutlich hat das Protein, wie alle übrigen Murein-assoziierten Proteine(PEp E und PEp F), keine direkte Wechselwirkung mit dem HPI-Layer, sondern eine indirekte über eine bis jetzt nicht identfizierte Zellwand-Komponente. Die Neben-PEp-Proteine PEp H, PEp I lassen sich nicht mit diesen Detergenzien von dem HPI-Layer abtrennen (siehe auch 3.2.3.2), PEp G läßt sich teilweise besser mit Begleitionen extrahieren. PEp J kann mit Begleitionen weitgehend quantitativ aus diesem (PEp-Protein-/HPI-Layer-) Komplex entfernt werden.

Anhand der gesammelten experimentellen Beobachtungen können die Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Zellwand wie folgt charakterisiert werden:

a) Die Protein-Protein-Wechselwirkungen von PEp C und PEp F in der Pink Envelope scheinen unterschiedlicher Natur zu sein. Ein Teil der PEp C- und PEp F-Proteinmoleküle kann in hohen Ausbeuten mit erhöhter Ionenstärke ohne den Einsatz von Detergenzien mit Begleitionen aus der Zellwand extrahiert werden (siehe Tafel 38 bis 41 sowie Tabellen 14, 15, 17 und 18). Diese Beobachtungen deuten auf ionische Protein-Protein-Wechselwirkungen dieser Proteine in der Pink Envelope hin.

   Ein Teil der PEp C- und PEp F-Proteine in der Pink Envelope verhält sich in Anwesenheit von Detergenzien mit Begleitionen anders. Diese Proteinmoleküle sind auch nach einer mehrfachen Detergensbehandlung mit Begleitionen nicht aus der Pink Envelope zu extrahieren. Sie bleiben auch nach einer solchen Detergensbehandlung (siehe Tafel 38, 40 und 41) Bestandteil des (PEp-Protein-/HPI-Layer-)Komplexes. Dies deutet auf andersartige Protein-Protein-Wechselwirkungen hin. Es handelt sich vermutlich um starke, möglicherweise hydrophobe Protein-Protein-Wechselwirkungen.Sie werden unter den experimentellen Bedingungen nicht mit den verwendeten Detergenzien (z.B. MEGA-10, Triton X-114, LDAO, SB-12) gebrochen. An dieser Stelle sei daran erinnert, daß diese ausgewählten Detergenzien, vor allem die nicht-ionischen, unfähig sind, Protein-Protein-Wechselwirkungen zu brechen (Helenius et al., 1979).

b) Ein Teil der PEp-Proteine, wie z.B. PEp A, PEp D und PEp K, zeigen eine hohe Affinität zum HPI-Layer. Diese Proteine lassen sich auch nach mehrfacher Detergensbehandlung mit oder ohne Begleitionen nicht aus der Pink Envelope entfernen; sie bleiben Bestandteil des (PEp-Protein-/HPI-Layer-)Komplexes (siehe Tafel 38, 40 und 41). Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß es sich um starke hydrophobe Protein-Protein-Wechselwirkungen handelt. Die benutzten Detergenzien sind offenbar zu schwach, um diese Protein-Protein-Wechselwirkungen aufzuheben.

Die Phasentrennungen nach einer Detergensextraktion der Zellwand mit dem Detergens Triton X-114 erlaubt, den Hydrophobizitätscharakter der identifizierten PEp-Proteine näher zu charakterisieren. Bordier (1982) zeigte, daß intrinsische Membranproteine mit ihrer amphiphilen Natur sich in der hydrophoben Phase befinden, während periphere Membranproteine sich in beiden Phasen lösen können. Die Ergebnisse, gewonnen aus Untersuchungen mit ganzen Bakterien und Pink Envelope, zeigen, daß als intrinsische Membranproteine folgende PEp-Proteine zu sehen sind: PEp A, PEp D, PEp J und PEp K und daß als periphere Membranproteine PEp C, PEp F und PEp G einzuordnen sind (siehe auch Tabelle 16).

3.2.5 Aminosäurenanalysen

3.2.5.1 Aminosäurenanalysen der Haupt-PEp-Proteine (Sark)

Die Werte für die Aminosäurenanalysen der PEp-Proteine PEp A, PEp B, PEp C und PEp D sind in Tabelle 19 zusammen aufgeführt. Der Vergleich der Analysenwerte zeigt, daß PEp B reicher an Asparaginsäure, Threonin und Valin als PEp A, PEp C und PEp D ist. PEp C zeigt hohe Werte an Lysin und PEp D einen erhöhten Methioninwert. PEp A, PEp C und PEp D zeigen einen erhöhten Prolin-Anteil. Insgesamt zeigen diese Analysen, verglichen mit den Aminosäurenzusammensetzungen bekannter Omp-Proteine (siehe 3.2.6.1), keine Besonderheiten. Erwähnenswert ist, daß sich bei den Aminosäurenbestimmungen kein Hinweis auf Aminozucker bei den Proteinen ergab (2.11.2).

3.2.5.2 Aminosäurenanalysen der HPI-Layer-Proteine (Sark, R_1) und einiger proteolytischer Spaltfragmente aus PEp B (R_1)

Die Aminosäurenanalysewerte für die HPI-Layer Proteine von Sark und R_1, sowohl aus Hydrolysaten der isolierten Layer

als auch aus denen der isolierten PEp-B-Polypeptide aus dem PAG, sind in Tabelle 20 dargestellt. Die Analysenwerte für das HPI-Layer-Protein von Sark weichen ab von denen aus Thompson et al. (1982). Die Werte für folgende Aminosäuren liegen in der Analyse von Thompson et al. (1982) höher: Histidin, Serin,Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Methionin, weiterhin liegen die Werte für folgende Aminosäuren niedriger: Threonin, Valin, Tyrosin und Phenylalanin. Das Bemerkenswerte bei der Analyse von Thompson et al. (1982) ist, daß Prolin als Aminosäure in dem HPI-Layer nicht vorkommt. Die Analysenwerte, erzielt für das HPI-Layer-Protein von R_1, stimmen insgesamt relativ mit denen aus Karrenberg (1981), Baumeister et al. (1982) überein. Einige Verschiebungen der Werte sind zu erwähnen. Die frühere Analyse zeigt niedrigere Werte für Histidin, Tryptophan und Valin und höhere Werte für Threonin, vor allem Asparaginsäure. Eine weitgehende Übereinstimmung ist bei dem Vergleich der Analysenwerte aus den HPI-Layer-Protein-Präparationen und aus den elektroeluierten HPI-Layer-Polypeptiden (PEp B) zu verzeichnen. Die Analysenwerte der beiden HPI-Layer-Präparationen aus Sark und R_1 sind nahezu identisch. Die Unterschiede für Asparaginsäure, Glutaminsäure und Glycin (bei den eluierten Polypeptiden) entstehen durch unvermeidliche,durch Manipulation bedingte Kontaminationen während der Elektroelution (Brown und Howard, 1983). Die Analysenresultate des PEp B-Polypeptids (R_1) zeigen zusätzlich niedrige Werte für Threonin, Valin und einen hohen Wert für Methionin. Die PEp B pf_1-, pf_5- und pf_7-Polypeptide weisen keinen markanten Unterschied zu dem PEp B-Polypeptid auf. Anders für PEp B pf_{13}: es zeigt hohe Werte für Arginin, Asparaginsäure, Tyrosin und Phenylalanin, niedrige Werte für Prolin und Valin.

Amino-säure mol/ 100 mol	PEp A MG app = 120 kD	PEp B MG app = 108 kD (*)	PEp C MG app = 64 kD	PEp D MG app = 47 kD
Lys	3.21	2.12	5.81	3.83
His	0.89	0.43	0.73	0.64
Arg	6.52	4.34	4.93	5.72
Trp	n.d.	0.66	n.d.	n.d.
Asx	11.68	14.28	10.26	9.35
Thr	7.85	11.57	6.67	8.66
Ser	7.93	7.30	7.98	6.12
Glx	8.60	7.08	10.00	9.16
Pro	3.69	4.47	4.60	4.77
Gly	11.66	10.14	10.53	11.39
Ala	11.92	11.00	11.67	12.91
Cys-SO_3H	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Val	6.98	11.32	6.91	8.40
Met	0.74	0.38	0.58	1.27
Ile	3.19	3.36	4.40	3.64
Leu	7.35	5.77	8.25	7.90
Tyr	3.60	2.87	2.58	2.73
Phe	4.18	3.25	4.04	3.52
Total	99.99	100.35	99.94	100.01

Tabelle 19: Aminosäureanalyse der Haupt-PEp-Polypeptide: PEp A, PEp B, PEp C und PEp D aus *Deinococcus radiodurans* Sark.
n.d. = nicht bestimmt.
(*) Das HPI-Layer-Protein wurde als Layer für die Aminosäureanalysen mit HCl hydrolysiert (siehe 2.11.2).

Aminosäure mol/ 100 mol	Stamm Sark		Stamm R_1					
	PEp B MG app = 108 kD (*)	PEp B Polypeptid MG app = 108 kD	PEp B MG app = 104 kD (*)	PEp B Polypeptid MG app = 104 kD	PEp B pf 1 MG app = 91 kD	PEp B pf 5 MG app = 58 kD	PEp B pf 7 MG app = 50 kD	PEp B pf 13 MG app = 15 kD
Lys	2.12	2.81	2.61	3.56	3.09	3.61	3.36	2.95
His	0.43	0.77	0.30	0.69	0.48	0.56	1.04	0.87
Arg	4.34	4.35	4.30	4.64	4.16	3.94	4.74	6.50
Trp	0.66	n.d.	0.99	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Asx	14.28	11.64	13.23	10.24	12.24	10.25	10.67	16.37
Thr	11.57	10.17	12.32	9.89	12.59	11.82	8.84	8.81
Ser	7.30	7.76	7.76	8.97	8.87	10.02	9.02	6.54
Glx	7.09	8.18	7.30	8.68	7.58	8.03	9.05	8.81
Pro	4.47	4.15	5.15	4.14	4.92	4.69	3.42	2.09
Gly	10.14	13.18	10.35	12.40	12.21	12.76	14.10	10.97
Ala	11.00	10.43	10.60	9.78	8.11	9.36	10.45	9.04
Cys-SO_3H	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Val	11.32	10.02	9.47	7.08	8.96	9.46	5.80	4.96
Met	0.38	0.59	0.50	1.08	0.74	0.76	0.87	0.26
Ile	3.36	3.49	3.27	3.91	3.69	3.08	3.97	3.45
Leu	5.77	6.21	6.00	7.51	6.47	5.75	7.54	6.63
Tyr	2.87	2.97	2.68	3.35	2.49	2.90	3.20	5.11
Phe	3.25	3.28	3.75	3.81	3.38	3.02	3.92	6.65
Total	100.35	100.00	100.58	100.00	99.98	100.01	99.99	100.00

Tabelle 20: Aminosäurenanalyse der HPI-Layer-Proteine: PEp B (undissoziiert) und der PEp B-Polypeptide aus *Deinococcus radiodurans* Stamm Sark und R_1. Aminosäurenanalyse der proteolytischen Spaltfragmente aus dem HPI-Layer-Protein vom Stamm R_1: PEp B pf 1, pf 5, pf 7 und pf 13 (siehe 3.1.2.3 und Tabelle 3).
(*) Das HPI-Layer-Protein wurde als Layer für die Aminosäurenanalyse mit HCl hydrolysiert (siehe 2.11.2)
n.d. = nicht bestimmt

3.2.6 Hydrophobizität der PEp-Proteine

3.2.6.1 Hydrophobizität der Haupt-PEp-Proteine aus *Deinococcus radiodurans* und Vergleich mit bekannten Omp-Proteinen sowie Cmp-Proteinen aus anderen Organismen

Die Hydrophobizitätsberechnungen wurden nach der Methode von Barrentes (1975), beschrieben in 2.11.3, durchgeführt. Die Resultate der Berechnungen und des Vergleichs sind in der Tabelle 21 zusammengetragen worden. Siebzehn bekannte Omp-Proteine und zwölf Cmp-Proteine aus unterschiedlichen Organismen wurden für den Vergleich ausgewählt. Omp-Proteine und Cmp-Proteine tragen den Charakter von intrinsischen Membranproteinen, die Z-Werte liegen zwischen 0.656 und 0.410. Der Schnittpunkt zwischen peripheren und intrinsischen Membranproteinen liegt nach Barrentes (1975) bei Z = 0.317. Als periphere Cmp-Proteine werden Glycophorin (Z = 0.273), Spectrin (Z = 0.003 für Bande 1 und Z = 0.008 für Bande 2), die α-Kette der Na^+/K^+-ATPase (Z = 0.309) und schließlich die Ca^{++}-ATPase (Z = 0.281) eingeordnet. Im Vergleich zu dieser Klassifizierung werden Glycophorin, die α-Kette der Na^+/K^+-ATPase und die Ca^{++}-ATPase in der Literatur (aufgrund von anderen biochemischen Befunden, z.B. partielle Verdauung mit Proteinase etc.) als intrinsische Membranproteine dargestellt (siehe Tabelle 21, C und D).

Alle Z-Werte der Omp-Proteine liegen unterhalb des Schnittpunktes, nämlich zwischen Z = 0.295 und Z = -1.458. Diese Proteine tragen nach Barrentes den Charakter von peripheren Membranproteinen. Einige Murein-assoziierte Omp-Proteine sind als extrem peripher einzuordnen, z.B. Omp (21 kD), Murein-Lipoprotein (aus *Escherichia coli*); Omp H und Omp I (aus *Pseudomonas aeruginosa*) (siehe Tabelle 21, A und B).

Die Z-Werte für die Haupt-PEp-Proteine von *Deinococcus radiodurans*, Sark, Z = 0.148 (PEp A), Z = 0.184 (PEp B), Z = 0.188

(PEp C), Z = 0.232 (PEp D) zeigen, daß PEp D das hydrophobste Protein ist. Die Z-Werte dieser PEp-Proteine unterscheiden sich nicht wesentlich von den Z-Werten bekannter intrinsischer Omp-Proteine, z.B. Omp F und Omp C sowie Omp Pho E aus *Escherichia coli* (siehe Tabelle 21, A und B).

Omp-Proteine, die in der Literatur aufgrund von anderen biochemischen Befunden als intrinsische Membranporteine bekannt sind, zeigen anhand ihrer Z-Werte peripheren Charakter. Dieser Befund kann durch deren Poren-Funktion in der äußeren Membran erklärt werden. Viele Omp-Proteine sind transmembrane Proteine, z.B. Omp C, Omp F, Omp Pho E, Omp Phage T_6 und Colicin-Rezeptor aus *Escherichia coli*, die Diffusionskanäle für hydrophile Metaboliten bilden (Nikaido und Vaara, 1985). Der Aufbau solcher Kanäle legt nahe, daß sich erhöhte hydrophile Aminosäurenanteile in der Primärstruktur solcher Proteine befinden. Die entsprechenden Aminosäuren sollten im Bereich der Poren lokalisiert sein. Die hydrophoben Bereiche der Sequenz sollten die Kontaktbereiche der Proteine zu den Lipiden gestalten.

3.2.6.2 Hydrophobizität der HPI-Layer-Proteine (Stamm Sark und R_1) und Hydrophobizitätsvergleich zwischen proteolytischen Spaltfragmenten des PEp B-Polypeptids (Stamm R_1)

Die Tabelle 22 faßt die Werte zusammen. Die Z-Werte der beiden HPI-Layer-Proteine (Stamm Sark und R_1) sind nahezu identisch, Z = 0.187 (Sark), Z = 0.178 (R_1). Die Berechnung ergibt anhand der Aminosäurenanalyse des PEp B-Polypeptids (R_1) einen höheren Z-Wert als für das undissoziierte Protein (die Erklärung liefern die Aminosäurenunterschiede, siehe 3.2.5.2). Die proteolytischen Spaltfragmente zeigen abnehmende Z-Werte von PEp B pf_1 zu PEp B pf_{13}. Aufgrand dieser Berechnungen zeigen diese proteolytischen Fragmente keinen hydrophoben Charakter.

Herkunft	*Escherichia coli*								*Salmonella typhimurium*		
Lokalisation	Om	Om	Om	Om	Om	Om	Om	Om	Om	Om	Om
Bemerkungen	Kontakt mit PG; Dimer	Trimer	Trimer	–	Trimer	–	PG asso-ziiert	PG asso-ziiert; Dimer	Trimer	Trimer	Trimer
Poren-Funktion	n.d.	+	+	+	n.d.	+	n.d.	n.d.	+	+	+
Protein-bezeichnung	(1) Omp A (1a)	(2) Omp C	(3) Omp F	(4) Omp Pho E	(5) Omp Lam B	(6) Omp Phase T6 /Colicin Rezeptor	(7) Omp (21 kD)	(8) Omp Lipo-protein	(9) Omp C	(9) Omp D	(9) Omp F
MG (kD)	35.1	38.3	37.2	36.8	47.4	26.0	21.0	7.2	39.8	38.0	39.3
R_3	1.154	1.192	1.047	1.292	1.301	1.521	1.530	2.333	1.181	1.222	1.200
$\bar{H}\Phi_{av}$ (kcal)	1.033	0.936	0.996	0.965	0.868	1.020	0.850	0.758	0.933	0.954	0.930
Z	0.221	0.150	0.236	0.133	0.071	0.087	-0.019	-0.351	0.152	0.150	0.144
Membranprotein-Charakter nach Barrentes (25)	peripher						extrem peripher		peripher		
Polaritätsindex nach Capaldi (26)	44.40	47.40	43.80	50.00	45.80	50.40	51.20	62.10	47.90	47.30	47.50
Einordnung nach der Literatur	intrinsisch						peripher		intrinsisch		

Tabelle 21: (A)

Herkunft	*Pseudomonas aeruginosa*				*Chromatium vinosum*	*Deinococcus radiodurans* (Sark)				*Neurospora crassa*	*Escherichia coli*
Lokalisation	Om	Om	Om	Om	Om	Om	S	IM	Om	Om	Cm
Bemerkungen	-	PG asso-ziiert	PG asso-ziiert	PG asso-ziiert	-	mit PEpB asso-ziiert; Dimer	RS-Layer; Hexamer	PG asso-ziiert	mit PEpB asso-ziiert; Dimer	Mitochon-drien	Proton-carrier
Poren-Funktion	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+	-
Protein-Bezeichnung	(10) Omp E	(10) Omp F	(10) Omp H	(10) Omp I	(11) Omp (42 K)	PEp A	PEp B	PEp C	PEp D	(12) Porin	Lactose Permease (13)+(14)
MG (kD)	n.d.	33	21	8	42	120	108	64	47	31	46.5
R_3	1.340	1.351	1.640	5.340	1.142	1.186	1.043	1.186	1.045	0.955	0.360
$\overline{H\Phi}_{av}$ (kcal)	0.919	0.891	0.820	0.640	0.912	0.930	0.908	0.996	0.988	1.041	1.300
Z	0.089	0.072	-0.077	-1.458	0.153	0.148	0.184	0.188	0.232	0.295	0.656
Membranprotein-Charakter nach Barrentes (25)	peripher		extrem peripher		peripher	peripher				peripher	intrin-sisch
Polaritätsindex nach Capaldi (26)	49.80	47.60	48.70	61.00	45.00	47.70	45.70	46.40	43.50	45.60	28.80
Einordnung nach der Literatur	intrinsisch		peripher		intrin-sisch	intrin-sisch(*)	n.d.(*)	peripher (*)	intrin-sisch(*)	intrinsisch	

Tabelle 21: (B) (*) Einordnung nach Kondensationsexperimenten mit Triton X-114 (siehe Tabelle 16)

Herkunft	*Halobacterium halobium*	*Rhodopseudomonas capsulata*			Erythrozyten (Human)					
Lokalisation	Cm	Cm			Cm				Cm	
Bemerkungen	Trimer; Protonpumpe	Thyllakoid-Membrane Antennenpigmentkomplex des Photosyntheseapparates			Dimer	Cm Außenseite	transmembraner Teil	Cm Innenseite	Membranskeleton; Dimeren, Oligomeren	
Poren-Funktion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proteinbezeichnung	*Bacteriorhodopsin* (15)	Antennenpolypeptid aus B-870-Komplex (16)	aus B-800-850-Komplex (17)	aus B-870-Komplex (18)	(19) Glycophorin (Vollersequenz)	← Sequenzteil → [1-73]	[74-95]	[96-131]	(20) Spectrin Bande 1	(20) Spectrin Bande 2
MG (kD)	26.5	12	10	7	55	-	-	-	240	220
R_3	0.382	0.393	0.476	0.667	1.026	1.529	0	1.750	1.590	1.588
$\bar{H}\Phi_{av}$ (kcal)	1.308	1.496	1.225	1.134	1.046	0.501	1.614	1.131	0.920	0.900
Z	0.653	0.762	0.571	0.450	0.273	-0.027	0.968	0.074	0.003	-0.008
Membranproteincharakter nach Barrentes (25)	intrinsisch	intrinsisch			peripher	peripher	intrinsisch	peripher	peripher	
Polaritätsindex nach Capaldi (26)	29.60	31.00	30.00	37.00	55.30	64.90	13.60	61.10	55.90	57.10
Einordnung nach der Literatur	intrinsisch				peripher		intrinsisch	peripher	peripher	

Tabelle 21: ©

Herkunft	*Rena medulla* (Porcine)		Skeletal Sarcoplasm Reticulum (Rabbit)	Mitochondrien (Beef Heart)	
Lokalisation	Cm	Cm	Cm	Cm	Cm
Bemerkungen	-		-	Dimer	heteromerer Proteinkomplex
Poren-Funktion	-		-	-	-
Proteinbezeichnung	Na^+/K^+ (21) ATPase		Ca^{++}/ ATPase (22)	ADP/ ATP Carrier (23)	Cytochrom -c- Oxidase Komplex (24)
	α Kette	ß Kette			
MG (kD)	93.9	32.3	115.0	30.0	183.0
R_3	0.997	0.783	0.925	0.824	0.764
$\bar{H}\Phi_{av}$ (kcal)	1.089	1.160	1.000	1.158	1.173
Z	0.309	0.426	0.281	0.410	0.440
Membranprotein-Charakter nach Barrentes (25)	peripher	intrinsisch	peripher	intrinsisch	intrinsisch
Polaritätsindex nach Capaldi (26)	43.90	40.30	42.58	37.50	42.10
Einordnung nach der Literatur	intrinsisch				

Tabelle 21: (D)

Tabelle 21: (A bis D)

Hydrophobizitätsvergleich von Om-Proteinen, Cm-Proteinen aus verschiedenen Organismen und Haupt-PEp-Proteinen aus *Deinococcus radiodurans* Sark. Für die Berechnungen der Hydrophobizitätswerte (Z) lagen Aminosäurenanalysen, Proteinsequenzen und Proteinsequenzen aus DNA-Sequenzen aus der Literatur vor. Für *Deinococcus radiodurans* Sark wurden die Aminosäurenanalysenwerte genommen (siehe Tabelle 19).

Die Literaturhinweise sind jeweils in Klammern in den verschiedenen Tabellenabschnitten gekennzeichnet. Die Aussage in der Spalte, benannt als "Einordnung nach der Literatur", ist aus der jeweiligen Literaturangabe,zugehörig zu einem Protein, entnommen. Diese Einordnung entstand aufgrund von anderen biochemischen Befunden. Die einzelnen Bemerkungen zu den jeweiligen Proteinen (aus anderen Organismen) wurden ebenfalls aus der angegebenen Literaturquelle entnommen. Die Bemerkungen zu den Omp-Proteinen von *Escherichia coli* wurden aus Lugtenberg und Van Alphen (1983) entnommen.

Abkürzungen:
- MG = Molekulargewicht
- R_3 = Ratio 3 (siehe 2.11.3)
- $\bar{H}\,\Phi_{av}$ = totale Hydrophobizität des Proteins (siehe 2.11.3)
- Z = Hydrophobizitätswert des Proteins (siehe 2.11.3)
- Om = äußere Membran
- Cm = cytoplasmatische Membran
- PG = Peptidoglycoan Layer = Murein
- S = Surface Layer
- IM = Intercalating Material
- n.d. = nicht ermittelt
- \+ = vorhanden
- \- = nicht vorhanden

Literatur: (1) Chen et al. (1980); (1a) Movva et al. (1980); (2) Mizuno et al. (1983); (3) Chen et al. (1982); (4) Overbeeke et al. (1983); (5) Clement und Hofnung (1981);(6) Manning und Reeves (1978); (7) Mizuno (1979); (8) Braun (1975);9Tokunaga et al. (1979); (10) Mizuno und Kageyama (1979); (11) Lane et al. (1980); (12) Freitag et al. (1982); (13) Ehring et al. (1980); (14) Büchel et al.(1980); (15) Ovchinnikov et al. (1979); (16) Peters (1984); (17) Tadros et al. (1983); (18) Tadros et al.(1984); (19) Cantor und Schimmel (1980); (20) Anderson(1979); (21) Freytag und Reynolds (1981); (22) Allen et al. (1980); (23) Babel et al. (1981); (24) Steffens (1980); (25) Barrentes (1975); (26) Capaldi und Vanderkooi (1972)

Proteinbezeichnung	Stamm Sark		Stamm R_1					
	PEp B (undissoziiert)(*)	PEp B-Polypeptid MG app = 108 kD	PEp B (undissoziiert)(*)	PEp B-Polypeptid MG app = 104 kD	PEp B pf 1 MG app = 91 kD	PEp B pf 5 MG app = 58 kD	PEp B pf 7 MG app = 50 kD	PEp B pf 13 MG app = 15 kD
R_3	1.049	1.045	1.081	1.040	1.070	1.057	1.141	1.312
$\overline{H\Phi}_{av}$ (kcal)	0.915	0.908	0.919	0.941	0.910	0.891	0.896	0.925
Z	0.187	0.184	0.178	0.206	0.176	0.170	0.144	0.102
Membranprotein-Charakter nach Barrentes (1)	peripher							
Polaritätsindex nach Capaldi (2)	47.13	45.68	48.81	46.67	49.01	48.23	46.72	50.85

Tabelle 22: Hydrophobizitätsvergleich der PEp B-Proteine und PEp B-Polypeptide aus dem Stamm Sark und R_1 und zwischen dem PEp B-Polypeptid des Stammes R_1 und seinen proteolytischen Spaltfragmenten. Für die Berechnungen der Z-Werte wurden die jeweiligen Aminosäurenanalysen zugrunde gelegt (siehe Tabelle 20).
(1) Barrentes (1975), (2) Capaldi et al. (1972).
(*) Das HPI-Layer-Protein lag als Layer vor.
Die apparenten Molekulargewichte der Polypeptide sind in Klammern eingetragen.
Abkürzungen: R_3 = Ration 3 (siehe 2.11.3)
$\overline{H\Phi}_{av}$ = totale Hydrophobizität des Proteins (siehe 2.11.3)
Z = Hydrophobizitätswerte des Proteins (siehe 2.11.3)

3.2.7 Histochemischer und elektronenmikroskopischer Nachweis der 5'-Nucleotidase und (3'→5')-Exonuclease in der Zellwand von *Deinococcus radiodurans* Sark

3.2.7.1 Nachweis der 5'-Nucleotidase (PEp D)

Es soll an dieser Stelle daran erinnert werden, daß der Nachweis einer von außen zugänglichen 5'-Nucleotidase-Aktivität an der Zelloberfläche von *Deinococcus radiodurans* R_1 zuerst von Mitchel (1973) erbracht wurde. Er ordnete dieses Enzym generell zu dem "middle cell wall-layer" (ein lipidreicher Layer aus hexagonal geordneten Untereinheiten, der carotinoidreich ist)(Work und Griffiths, 1968). Der Autor machte keine genaueren topographischen Angaben. Das Enzym wurde als hydrophob charakterisiert,und es wurde ein apparentes Molekulargewicht von 44 kD ermittelt. Eine hohe Aktivität dieses Enzyms wurde an ganzen Zellen und Pink Envelope gemessen (Ubrig und Baumeister, unveröffentlichte Daten).

Der histochemische und elektronenmikroskopische Nachweis der 5'-Nucleotidase wurde nach der kombinierten Methode von Wachstein und Meisel (1957) und Nisonson et al. (1969), wie in 2.10.5.1 beschrieben, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tafel 42 dargestellt. Die Kontrollwerte (siehe Abb. A und D) zeigen einen leichten Hintergrund an Bleiphosphatniederschlägen, verursacht durch die Gegenwart von Phosphationen in der Kohlenhydratkapsel bei den ganzen Bakterienzellen und bei den Pink Envelope-Proben. Die Nachweisreaktion lief positiv für ganze Bakterienzellen und Pink Envelope. Die Umwandlung des *in vitro* angebotenen Substrats (Nucleotid in Form von AMP) in Nucleosiden und Phosphationen wird durch Bleiphosphatniederschläge dokumentiert. Die kontrastierenden Niederschläge sind bei den ganzen Zellen ausschließlich an der Oberfläche des Bakteriums deponiert, sie dringen durch

die Kohlenhydratkapsel hindurch bis zu der Oberfläche der Außenmembran, wo sie stark konzentriert erscheinen. Sie penetrieren offenbar durch das offene Strukturnetzwerk des HPI-Layers und bilden die Konturen des Layers im Querschnitt (siehe Tafel 42, Abb. B, Pfeilzeichen) ab. In tieferen morphologischen Strukturen der Zellwand sind keine Bleiphosphatniederschläge sichtbar. Entsprechende Ergebnisse wurden an der Pink Envelope erzielt (siehe Tafel 42, Abb. E). Die Kontrastierung durch die Bleiphosphatniederschläge ist sehr intensiv auf der äußeren Seite der Envelope. Auch hier penetrieren sie durch die offene Struktur des HPI-Layers bis zur Oberfläche der Membran. Der Niederschlag verursacht einen Negativkontrast, der die einzelnen Hexamere des HPI-Layer-Proteins im Querschnitt in einer bemerkenswerten Weise darstellt. Im Gegensatz zu den ganzen Bakterien zeigt die Pink Envelope Bleiphosphatniederschläge (in geringerem Maß) auf der Innenseite der Envelope.

3.2.7.2 Nachweis der (3'→5')-Exonuclease (PEp A)

Der Nachweis der von außen zugängigen Aktivität einer (3'→5'-)Exonuclease an ganzen Bakterienzellen von *Deinococcus radiodurans* R_1 wurde zum erstenmal von Gentner und Mitchel (1975) erbracht. Auch da wurde das Enzym als ein Membran-gebundenes Protein des "middle cell wall layers", wie im Fall der 5'-Nucleotidase beschrieben (siehe 3.2.7.1). Eine genauere Lokalisation blieb aus. Mitchel (1978) beschrieb das Enzym als eine (3'→5'-)Orthophosphoric diester Phosphohydrolase (EC 3.1.4.1), die imstande ist, einzelne DNA- und RNA-Stränge vollständig zu 5'-Mononucleotiden abzubauen. Weiterhin ermittelte er ein apparentes Molekulargewicht für das Monomer des Enzyms von 125 kD. Schon Gentner und Mitchel (1975) postulierten ohne weitere experimentelle Befunde, daß die (3'→5'-)Exonuclease anhand ihrer Funktion in der Lage wäre, vermutlich in Kooperation

gemeinsam mit der 5'-Nucleotidase an der Zelloberfläche fremde DNA zu Deoxynibonucleotide abzubauen. Die Reaktionsprodukte der (3'→5'-)Exonuclease stellen genau das benötigte Substrat der 5'-Nucleotidase her. Die sich ergänzenden Abbaufunktionen dieser beiden Enzyme und ihre enge Nachbarschaft in der äußeren Membran (siehe 3.2.3.1) legten nahe, die folgenden Versuche durchzuführen.

Wenn denaturierte DNA (als Substrat) der aktiven (3'→5'-) Exonuclease *in vitro* angeboten wird, baut dieses Enzym das Substrat in 5'-Stellung phosphorylierte Nucleoside ab; diese wiederum können durch die 5'-Nucleotidase entphosphoryliert werden, und Nucleoside plus Phosphate werden freigesetzt. Die frei gewordenen Phosphationen können dann mit den zugeführten Bleiionen (in Form von Bleinitrat) kontrastierende Bleiphosphatniederschläge bilden (siehe 3.2.7.1). Damit könnte die Aktivität der 5'-Nucleotidase gleichzeitig rückschlüssig den Nachweis der (3'→5'-)Exonuclease-Aktivität erbringen und zu ihrer Lokalisierung beitragen.

Die Ergebnisse dieses Versuchs an ganzen Bakterien und Pink Envelope sind in der Tafel 42, Abb. C und F dargestellt. Die Leerwerte ergaben identische negative Resultate, wie im Falle des 5'-Nucleotidase-Nachweises (siehe Tafel 42, Abb. A und 3.2.7.1). Die Versuche zum Nachweis der(3'→5'-) Exonuclease an ganzen Zellen und Pink Envelope verliefen positiv. Die Bleiphosphatniederschläge sind in der Kohlenhydratkapsel der ganzen Bakterienzellen vorhanden und werden verstärkt oberhalb des HPI-Layers beobachtet. Sie durchdringen offensichtlich dessen offenes Netzwerk und lagern sich an der Oberfläche der äußeren Membran an, ohne in tiefere Zellwandschichten zu penetrieren. Die Niederschläge sorgen für eine Negativkontrastierung des HPI-Layers.

Die Pink Envelope liefert das gleiche Bild und Ergebnis. Eine intensive Kontrastierung auf die äußere Seite der Envelope ist sichtbar. Die Niederschläge des Bleiphosphats

reichen bis zu der äußeren Oberfläche der Außenmembran hin. Das HPI-Layer-Protein wird dadurch negativ kontrastiert. Die Hexamere werden im Querschnitt gut sichtbar. Einige Bleiphosphatniederschläge sind auf der inneren Seite der Membran zu sehen. Mitchel (1975) berichtet über zwei funktionelle Seiten der Exonuclease, eine aktive Seite auf der äußeren Seite der Membran (von außen zugänglich) und eine maskierte aktive Seite, die von außen nicht zugänglich ist.

Zusammenfassung der Ergebnisse

- In 3.2.7.1 wurde das Vorhandensein einer aktiven 5'-Nucleotidase (PEp D-Protein) sowohl in ganzen Bakterien als auch in Pink Envelope nachgewiesen und dargestellt. Das Substrat kann nach der Penetration der Bleiphosphatniederschläge durch das offene HPI-Layer-Netzwerk bis zu der darunter liegenden Membran durchdringen. Das intrinsische membrangebundene Enzym besitzt offenbar ein aktives Zentrum, das von außen für das Substrat zugänglich ist.

- Die Resultate, erzielt in 3.2.7.2, werden wie folgt zusammengefaßt:

a) Das Vorhandensein einer aktiven (3'→5')-Exonuclease (PEp A-Protein) in der äußeren Membran des Bakteriums wurde elektronenmikroskopisch nachgewiesen.

b) Das Enzym hat zumindest eine aktive Seite nach außen gerichtet. Das Substrat kann durch das offene Netzwerk des HPI-Layers diffundieren und ist für das Enzym zugänglich.

c) Die vermutete Kooperation zwischen der (3'→5')-Exonuclease (als Substratlieferant für die 5'-Nucleotidase) und der 5'-Nucleotidase wurde bewiesen. Dieser Befund unterstreicht die enge Nachbarschaft der beiden Enzyme (PEp A und PEp D) in der äußeren Membran des Bakteriums.

- Der gleiche Befund ergab sich beim Stamm R_1 sowohl an ganzen Bakterienzellen als auch an Pink Envelope (die Resultate wurden hier nicht gezeigt).

4. Diskussion

4.1 Katalog der PEp-Proteine (R_1, Sark)

Die Herstellung von nahezu unproteolysierten Zellwandpräparationen gelang nur bei dem Stamm Sark, der Stamm R_1 wies immer noch eine restliche Proteinaseaktivität in der Zellwand auf und damit eine Restproteolyse. Die Anwesenheit des frisch zugefügten Inhibitors (PMSF) in allen Präparationsschritten war notwendig, um die Proteolyse zu unterdrücken. PMSF ist für die membrangebundene Proteinase von *Deinococcus radiodurans* ein kompetitiver Inhibitor (Emde, 1985). Mit Hilfe der Peptide Mapping-Technik war es möglich, die niedermolekularigen Fragmente der Hauptpolypeptide, erzeugt durch Proteolyse in dem Bandenmuster des SDS-PAGE zu identifizieren. Die Identifizierung dieser Polypeptide,bezeichnet als PEp pf, machte eine Katalogisierung erst möglich.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, besteht der Katalog der PEp-Proteine aus vier Hauptproteinen mit apparenten Molekulargewichten von 120 kD bis 47 kD und acht Nebenproteinen mit apparenten Molekulargewichten von 43 kD bis 20 kD (siehe Tabelle 11 in 3.1.3.6.1.1).Einige Unterschiede zwischen den Stämmen R_1 und Sark ergaben sich im apparenten Molekulargewicht für PEp B, PEp H und PEp K. Die beobachteten variablen Nebenproteine in dem Katalog konnten nicht näher als eigenständige Proteine identifiziert werden. Ihr Vorhandensein ist nicht von Präparation zu Präparation konstant. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese Polypeptide proteolytische Fragmente von anderen Proteinen darstellen.

Die PEp-Proteine von Stamm R_1 und Sark sind weitgehend homolog. Die HPI-Layer-Monomere (PEp B) von R_1 und Sark weisen leichte Homologieunterschiede auf (siehe 3.1.3.6.2.2 und 3.1.3.6.3). Diese kleinen Unterschiede sind elektronenmikroskopisch nicht sichtbar (siehe 3.1.2.3). Die S-Layer dieser

beiden Stämme sind hinsichtlich ihrer Gitterkonstanten von 18 nm, der P_6-Symmetrie, der Masse ihrer Einheitszellen und morphologisch bis zu einer Auflösung von 2.5 nm identisch (Rachel et al., 1983). Die Aminosäurenzusammensetzung dieser beiden S-Layer-Proteine ist ebenfalls weitgehend identisch, wie auch ihre Hydrophobizität (siehe 3.2.5.2 und 3.2.6.2).

Die Zusammensetzung des PEp-Katalogs der *Deinococcus radiodurans* Sark (CL^-)-Mutante zeigt, daß, wenn die Kohlenhydratkapsel nicht gebildet wird, der Katalog der Proteine unverändert bleibt. Die gleiche Beobachtung bezüglich der Zusammensetzung des Katalogs konnte mit der *Deinococcus radiodurans* Sark (HPI^-)-Mutante gemacht werden. Das Nichtvorhandensein des HPI-Layers wird nicht durch das Fehlen von einem oder mehreren PEp-Proteinen begleitet (siehe 3.1.3.6.1). Mutanten mit veränderten äußeren Zellwänden wurden bei den Enterobakterien (z.B. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) in der Literatur beschrieben. Allgemein wurde bei diesen Organismen beobachtet, daß der Verlust einer Zellwandkomponente (vor allem der äußeren Membran) eine kompensative Reorganisierung in der Membran induziert. Mehrere Beispiele für solchen molekularen Umbau wurden beschrieben. Das Nichtvorhandensein eines Hauptproteins wurde kompensiert durch andere erhöhte Protein-Lipopolysaccharid- oder Phospholipidanteile (Lugtenberg und Van Alphen, 1983). Das HPI-Layer-Protein ist kein direkter Bestandteil der äußeren Membran. Es braucht also bei der Mutante (HPI^-) des Stammes Sark offenbar nicht kompensiert zu werden.

Der Einfluß der Solubilisierungstemperatur auf die Dissoziation der Proteinkomponenten der Pink Envelope zeigt, daß eine quantitative Dissoziation erst ab ca. 80°C eintritt. Bei niedrigen Solubilisierungstemperaturen bleiben noch Aggregate vorhanden, die nicht in die Gelmatrix des Trenngels hineindringen (siehe 3.2.1). Als hitzemodifizierbares Protein in SDS-Lösung wurde nur das Protein PEp D in der

Pink Envelope identifiziert. Das Phänomen der Hitzemodifizierbarkeit wurde häufig für Proteine aus äußeren Zellwänden bei unterschiedlichen bakteriellen Organismen erwähnt (Lugtenberg und Van Alphen, 1983; Flamman und Weckesser, 1984). Nakamura und Mizushima (1976) haben die Ursache dieses Verhaltens näher untersucht. Die hitzemodifizierbaren Omp-Proteine aus *Escherichia coli* K 12 sind reich an ß-Strukturen. Die Sekundärstrukturen sind zuerst stabil in SDS-Lösung und werden erst durch Hitzeeinwirkung labil. Sie nehmen eine andere Konformation, die sich dann in eine Mobilitätsänderung in der SDS-PAGE übersetzen läßt. Der Übergang könnte ß-Struktur $\xrightarrow{\Delta T(°C)}$ "random coil" lauten. Diese Umfaltung der Primärstruktur impliziert eine Erhöhung des Stoke'schen Radius und dadurch eine niedrigere Mobilität in der SDS-PAGE.

Zu den bereits diskutierten Proteinbestandteilen der Pink Envelope kommen noch zusätzlich Komponenten aus anderen Stoffklassen. Die äußere Membran besteht einerseits aus nicht näher identifizierten polaren Lipiden (mit Esterbindung; siehe 3.1.3.5.3): Phosphoglycolipide (mit Glucose-Anteilen), Glycolipide sowie apolare Lipide wie Carotinoide (Thompson et al., 1980; Thompson, 1981) und andererseits aus Lipopolysacchariden (siehe 3.1.3.3). Die Lipide, so weit in *Deinococcus radiodurans* charakterisiert, nehmen eine besondere Stellung ein. Das Bakterium verfügt nicht über die üblichen bakteriellen Phospholipide (wie Phosphatidylcholin, Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol) (Thompson et al., 1980). Die Pink Envelope besitzt einen noch weitgehend unidentifizierten Zuckeranteil (siehe 3.1.3.5.3). Work und Griffiths (1968) fanden bei ihrer mureinfreien Zellwandpräparation ("middle cell wall layer": es entspricht ungefähr der Pink Envelope) D-Glucose, Mannose und Rhammose als Hauptbestandteile der Kohlenhydrate. Den größten Teil der Zucker dürfte die Kohlenhydratkapsel ausmachen, Emde (1980) zeigte, daß diese kaum durch Glycosidasen, wie

z.B. Dextranase und L. Glucosidase, abzubauen war. Thompson (1981) beschreibt saure Kohlenhydrate, die in der wässerigen Phase einer Phenolextraktion (65°C) aus dem "compartmentalized layer" (es entspricht ungefähr dem Intercalating Material) extrahierbar sind.

4.2 Die Topographie der PEp-Proteine aus *Deinococcus radiodurans*, Stamm Sark

Topographische Studien an Zellwänden von Bakterien setzen sich aus einer Summation unterschiedlicher experimenteller Beobachtungen zusammen (Lugtenberg und Van Alphen, 1983). Diese können in sechs Klassen eingeteilt werden:

a) Anwesenheit von Membranproteinen an der Zelloberfläche
b) Protein-Murein-Wechselwirkung
c) Protein-Protein-Wechselwirkung
d) Extraktion von Membranproteinen mit erhöhter Ionenstärke
e) Extraktion von Membranproteinen mit Detergenzien (mit oder ohne Begleitionen)
f) Hydrophobizitätscharakter eines Membranproteins

Die experimentellen Daten, die mit den unterschiedlichen Methoden erarbeitet wurden, sind in Tabelle 23 zusammengetragen. Die Tafel 43 stellt den Versuch dar, den molekularen Aufbau der äußeren Zellwand von *Deinococcus radiodurans* Sark bildhaft zu veranschaulichen.

PEp-Proteine und deren Lokalisierung in der PE	Anwesenheit an der Zelloberfläche (1)	Protein - Murein Wechselwirkung (2)	Protein - Protein Wechselwirkung (3)
PEp A (OM)	(3'→5')-Exonuclease-Aktivität an der Zelloberfläche in Ultradünnschnitten durch Bleiphosphatniederschläge darstellbar	kein Hinweis	Dimere und Heterodimere mit PEp D werden mit DTSP vernetzt - bei niedrigen Temperaturen(40°C in SDS und 5°C in LiDS) komplexiert mit dem HPI-Layer - wird an dessen Innenseite mit DTSP vernetzt
PEp B (S)	darstellbar an der Zelloberfläche durch Gefrierätzung und Ultradünnschnitte	kein Hinweis	Einheitszelle aus Hexamer gebildet - PEpA,D,G,H, I,K werden auf seiner Innenseite mit DTSP vernetzen - bilden mit diesen Proteinen(und PEp C) undissoziierbaren (PEp-Protein/HPI-Layer-)Komplex in milden Detergenzien
PEp C (IM)	kein Hinweis	bis T = 40°C in SDS mit Murein verbunden und im Lysozym-Hydrolysat des Mureins anwesend	ist Bestandteil des undissoziierbaren (PEp-Protein/HPI-Layer-)Komplexes in milden Detergentien
PEp D (OM)	5'-Nucleotidase-Aktivität an der Zelloberfläche in Ultradünnschnitten durch Bleiphosphatniederschläge darstellbar		Dimere, Heterodimere mit PEp A werden mit DTSP vernetzt - wird an der Innenseite des HPI-Layers mit DTSP vernetzt
PEp E (IM)	kein Hinweis	bis T = 100°C in SDS mit Murein verbunden und im Lysozym-Hydrolysat des Mureins anwesend	kein Hinweis
PEp F (IM)	kein Hinweis	im Lysozym-Hydrolysat des Mureins anwesend	kein Hinweis
PEp G (OM)	kein Hinweis	kein Hinweis	wird mit DTSP an der Innenseite des HPI-Layers vernetzt
PEp H (OM)	kein Hinweis	kein Hinweis	idem
PEp I (OM)	kein Hinweis	kein Hinweis	idem
PEp J (OM)	kein Hinweis	kein Hinweis	kein Hinweis
PEp K (OM)	kein Hinweis	kein Hinweis	Dimere, Trimere werden mit DTSP vernetzt - wird an der Innenseite des HPI-Layers mit DTSP vernetzt
PEp P (OM)	Proteinase-Aktivität an der Zelloberfläche durch Silbermarkierung darstellbar (7)	kein Hinweis	kein Hinweis

Tabelle 23: (A)

PEp-Proteine und deren Lokalisierung in der PE	Extraktion mit erhöhter Ionenstärke (4)	Extraktion mit milden Detergenzien (5)	Hydrophobizitätscharakter (6)
PEp A (OM)	kein Hinweis	kann nur mit Detergenzien (mit oder ohne Begleitionen) extrahiert werden	intrinsisch
PEp B (S)	kein Hinweis	kann nicht mit milden Detergenzien extrahiert werden, nur mit anionischen Detergenzien(SDS-LiDS)	n.d.
PEp C (IM)	kann mit 0.2 M KCl aus der PE isoliert werden	kann z.T. selektiv mit Detergenzien plus Begleitionen extrahiert werden	peripher
PEp D (OM)	kein Hinweis	kann nur mit Detergens (mit oder ohne Begleitionen) extrahiert werden	intrinsisch
PEp E (IM)	kann mit 0.2 M KCl aus der PE isoliert werden	kann mit Detergens plus Begleitionen extrahiert werden	n.d.
PEp F (IM)	kann mit 0.2 M KCl aus der PE isoliert werden	kann z.T. selektiv mit Detergenzien plus Begleitionen extrahiert werden	peripher
PEp G (OM)	kein Hinweis	kann effizienter mit Detergenzien plus Begleitionen extrahiert werden	peripher
PEp H (OM)	kein Hinweis	kann kaum mit Detergentien (mit oder ohne Begleitionen) extrahiert werden	n.d.
PEp I (OM)	kein Hinweis	idem	n.d.
PEp J (OM)	kein Hinweis	kann effizienter mit Detergenzien plus Begleitionen extrahiert werden	intrinsisch
PEp K (OM)	kein Hinweis	kann kaum mit Detergenzien (mit oder ohne Begleitionen) extrahiert werden	intrinsisch
PEp P (OM)	kein Hinweis	kann nur mit Detergenzien (bis jetzt wurde nur SDS getestet) extrahiert werden (7)	n.d.

Tabelle 23: (B)

Tabelle 23: (A und B) Topographie der PEp-Proteine anhand von experimentellen Beobachtungen
Die zusammengetragenen Beobachtungen stammten aus dem Ergebnisteil (siehe Kap. 3):
Diese wurden in sechs Klassen eingeteilt (siehe Einleitungsteil zu 4.2)

Hinweise zu den jeweiligen Klassen:
(1) siehe 3.1.1, 3.2.3.2.1 und 3.2.7
(2) siehe 3.1.3.6.1.2 und 3.2.2
(3) siehe 3.2.1, 3.2.3 und 3.2.4
(4) siehe 3.1.3.6.1.2 und 3.2.4
(5) siehe 3.2.4
(6) siehe 3.2.4.2.3
(7) siehe Emde (1985)

Die benutzten "milden" Detergenzien sind:
MEGA-10, Triton X-114, LDAO, SB-12 (siehe 3.2.4)

Abkürzungen: n.d. = nicht bestimmt
S = S-Layer (HPI-Layer)
OM = äußere Membran
IM = Intercalating Material
PE = Pink Envelope
DTSP = Dithiobis-(succinimidylpropionat)

4.2.1 Die Aussagekraft der Vernetzungsergebnisse mit DTSP

Nachbarschaftsuntersuchungen von Proteinen mit Hilfe des spaltbaren chemischen Vernetzers DTSP wurde mit verschiedenen biologischen Membransystemen durchgeführt (Wang und Richards, 1974; Reithmeier und Bragg, 1977; Palva, 1979; Angus und Hancock, 1983; Jay et al., 1983; Peters und Drews, 1983; Peters, 1984). Die beobachteten Vernetzungen zwischen Proteinen werfen immer wieder die Frage auf, ob sie tatsächliche Nachbarschaften *in situ* wiedergeben oder ob diese diffusionsbedingt und damit zufällig entstanden sind.

Die Frage der Artefaktbildung könnte ausgeräumt werden, wenn die Integrität und damit die Funktionsfähigkeit der Zellwand bzw. äußeren Membran bewiesen werden könnte (z.B. durch den Nachweis von enzymatischen Aktivitäten in der Zellwand nach einem Vernetzungsversuch). In der Literatur ist beschrieben, daß membrangebundene Enzyme wie die ATPase, NADH-Dehydrogenase z.B. bei *Escherichia coli* schon durch geringere Mengen

an DTSP stark inaktiviert werden (siehe Peters und Richards, 1977). Bestimmte Aminogruppen sind in vielen Enzymen essentiell für die katalytische Funktion (siehe Stryer, 1981) und werden offenbar durch den Vernetzer so chemisch verändert, daß die Funktion des Enzymes beeinträchtigt wird.

Es wurde in 3.1.3.5.1 gezeigt, daß die Pink Envelope, wenn sie durch das Detergens Triton X-100 von cytoplasmatischer Membrankontamination befreit wurde, einen Verlust an Lipiden und Lipopolysacchariden zeigt. Dieser Verlust deutet auf gewisse Veränderungen in der Zellwand hin.

Aus dem bisher Gesagten kann man schließen, daß eine Überprüfung der Integrität der Pink Envelope nach einem Vernetzungsversuch allein anhand der enzymatischen Aktivität von membrangebundenen Enzymen (wie z.B. der 5'-Nucleotidase, (3'→5')-Exonuclease; unabhängig davon, ob diese durch DTSP inaktiviert werden oder nicht) kein zuverlässiges Kriterium darstellt. Für die Integrität können folglich nur Indizien herangezogen werden. Zu diesem Zweck wurden Vernetzungsversuche mit Zellwänden und Pink Envelope,präpariert mit und ohne Triton X-100-Behandlung, durchgeführt. Die Vernetzungsexperimente ergaben ähnliche Vernetzungsbefunde (siehe 3.2.3.1.1). Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, daß die Versuche an nicht perturbierten Zellwand- und Pink Envelope-Präparationen gemacht wurden.

Um die Möglichkeit einer Vernetzung durch laterale Diffusion zufällig benachbarter Polypeptide zu prüfen, wurden photoaktivierbare Vernetzer für das Prinzip der Millisekunden-Vernetzung eingeführt (z.B. siehe Kiehm und Ji, 1977). Kiehm und Ji (1977) setzten Vernetzer ein, die das Vernetzungsereignis kleiner als die mittleren Zeiten zwischen zwei Zusammenstößen diffundierender Proteine (die aus Diffusionskoeffizienten errechnet wurden) beschränken. Diffusionsbedingte Vernetzung sollte, wenn überhaupt möglich, bei einem langlebigen Vernetzer wie DTSP häufiger

sein als bei einem kurzlebigen photoaktivierbaren wie APDP (4-Azidophenyl-dithio-succinimidyl-propionat). Es liegen aus der Literatur Hinweise vor, daß der Vernetzer DTSP, dessen funktionelle Gruppen theoretisch viele Kollisionen zwischen Proteinen in der Membran überdauern können, verglichen mit den photoaktivierbaren Vernetzern keine Zufallsvernetzung herbeiführt (Kiehm und Ji, 1977; Ji, 1979). Peters und Drews (1983), Peters (1984) fanden bei Vernetzungen an photochemischen Reaktionszentren von *Rhodopseudomonas capsulata* mit dem Vernetzer DTSP und dem photoaktivierbaren Vernetzer APDP keine Hinweise auf Zufallsvernetzungen.

Auffällig bei den Vernetzungsversuchen in dieser Arbeit sind die unterschiedlichen Vernetzungsausbeuten. Geringe Vernetzungsausbeuten werden bei PEp C, E, F, G und J beobachtet (siehe 3.2.3). DTSP vernetzt nur Lysin. Alle Hauptproteine der Pink Envelope enthalten potentiell vernetzbare Lysinreste (siehe 3.2.5). Dies deutet darauf hin, daß die sterische Orientierung funktioneller Gruppen innerhalb der Polypeptide eine wesentliche Rolle für die Vernetzungswahrscheinlichkeit spielt. Durch die Abhängigkeit der Vernetzung von sterischen Faktoren werden bestimmte Vernetzungsprodukte nicht oder nur in minimaler Ausbeute gebildet. Die niedrige und nicht signifikante Vernetzungsausbeute einiger Polypeptide, die aber reich an Lysin sind (z.B. PEp C), deutet auf die Rigidität der Zellwand während des Vernetzungsversuchs hin.

Aus dem bisher Gesagten ergibt sich, daß die Vernetzungsdaten, erzielt mit dem Vernetzer DTSP an der Pink Envelope von *Deinococcus radiodurans* Stamm Sark, die Nachbarschaft permanent assoziierter Polypeptide in der Envelope mit großer Wahrscheinlichkeit darstellen. Folglich eignet sich die reversible chemische Vernetzung mit DTSP durchaus zur Ermittlung von Nachbarschaften zwischen Polypeptiden der Pink Envelope bzw. äußeren Zellwand von *Deinococcus radiodurans* Sark.

4.2.2 Das Intercalating Material

Es besteht aus drei Proteinen: PEp C, PEp E und PEp F. Das Hauptprotein ist PEp C. Diese Proteine füllen den Raum zwischen äußerer Membran und Murein aus. Alle Proteine gemeinsam haben eine Wechselwirkung mit dem Murein, wobei diese unterschiedlichen Charakter haben kann. PEp C und PEp E sind Murein-assoziierte Proteine. Sie zeigen eine intensive Protein-Murein-Wechselwirkung, die für PEp C in Anwesenheit von SDS bis zu einer Solubilisierungstemperatur von 40°C noch aufrecht erhalten wird,und die für PEp E am stärksten ist, dieses Protein bleibt bis zu einer Solubilisierungstemperatur von 100°C noch mit dem Murein in Verbindung (siehe 3.2.2).

Die Wechselwirkung von PEp F mit dem Murein wird in Anwesenheit von SDS schon bei einer relativ niedrigen Solubilisierungstemperatur (ca. 25°C) aufgehoben. Das Protein ist aber aus der Zellwand extrahierbar und mit PEp C und PEp E im Lysozym-Hydrolysat des Mureins vorhanden (siehe 3.1.3.6.1.2). Diese Proteine haben weiter gemeinsam, daß sie mit erhöhter Ionenstärke (0.2 M KCl) aus der Pink Envelope extrahierbar sind (siehe 3.1.3.6.1.2).

Der hydrophile Charakter dieser Proteine wurde in den Kondensationsexperimenten mit dem Detergens Triton X-114 für PEp C und PEp F bestätigt (siehe 3.1.3.6.1.2 und Tabelle 16). Ionische Wechselwirkungen scheinen für diese Proteine von Bedeutung zu sein. Sie können auch mit Detergenzien in Anwesenheit von Begleitionen extrahiert werden (siehe Tabelle 23 B).

Unklar ist, welcher Art die Protein-Protein-Wechselwirkung dieser PEp-Proteine sind. Erwähnenswert ist, daß im Lysozymhydrolysat des Mureins, gewonnen aus Zellwänden nach einem Vernetzungsversuch, diese Proteine wohl zu Oligomeren vernetzt werden. Nach Aufhebung der Vernetzung erscheinen PEp C und PEp E als Banden in der SDS-PAGE (in der Arbeit nicht gezeigtes Resultat).

Die Proteinmoleküle des Intercalating Material besitzen anscheinend unterschiedliche Wechselwirkungen (z.B. Protein-Protein, Protein-Murein, Protein-Lipid) in der Zellwand. Zu beobachten war, daß einige dieser Proteinmoleküle eine stärkere Wechselwirkung zum Murein, andere eher zur äußeren Membran haben (siehe Tabelle 23 und 3.2.4.5). Diese Feststellung ist für Zellwandproteine von Bakterien nicht ungewöhnlich. Das Lipoprotein von *Escherichia coli* (das Hauptprotein, das in Wechselwirkung mit dem Murein steht (siehe Tafel 44 und 4.3) ist ein Beispiel dafür. Das Proteinmolekül existiert in zwei Konfigurationen: es kann kovalent mit dem Murein verknüpft sein oder auch nicht (dann als freie Form bezeichnet)(Lugtenberg und Van Alphen, 1983). Ob die PEp-Proteine des Intercalating Material Lipoproteine sind, kann zur Zeit nicht beantwortet werden.

Das Hauptprotein PEp C (siehe Katalog in Tabelle 11 in 3.1.3.6.1.1) ist als hauptsächliche Komponente des Intercalating Material anzusehen. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß dieses Molekül als "Distanzstück" zwischen dem Murein und der äußeren Membran fungiert. Die Schichtdicke des Intercalating Material (gemessen an Abbildungen von Ultradünnschnitten unter Verwendung konventioneller Einbettungstechniken (siehe 2.10.2.2)) beträgt ca. 25 nm (Emde et al., 1980). Dies ist eine beachtliche Distanz. Läge das Protein PEp C als gestreckte α-Helix-Struktur vor, könnte das Molekül theoretisch ca. dreimal diese Länge überbrücken. Andererseits ist es möglich, daß die Schichtdicke des Intercalating Material in Realität wesentlich kürzer ist. Dubochet et al. (1983) sowie Hobot et al. (1984) zeigen mittels neuer elektronenmikroskopischer Techniken (wie 'frozen-hydrated sections' und 'freeze substitution'),angewendet auf Gram-negative Bakterien (z.B. *Escherichia coli*), daß die Struktur der Zellwand zwischen der cytoplasmatischen Membran und der äußeren Membran uniform ist. Die gerade erwähnten neuen elektronenmikroskopischen Präparationstech-

niken sind schonender für die Präparate als konventionelle Einbettungstechniken (siehe oben im Text), deren Dehydrationsprozesse bei der Herstellung der Präparate zu Artefaktbildung führen. Hobot et al. (1984) schlagen aufgrund ihrer Ergebnisse vor, daß das Murein den gesamten Zwischenraum zwischen den beiden Membranen der Zellwand in der Form eines periplasmatischen Gels ausfüllt. Demnach wäre dieses Gel eine Gel-Matrix aus quervernetztem Murein. Auf die Zellwand von *Deinococcus radiodurans* übertragen, läßt die Hypothese von Hobot et al. (1984) die Möglichkeit zu, daß die Distanz zwischen der cytoplasmatischen Membran und der äußeren Membran mit einer periplasmatischen Gel-Matrix aus quervernetztem Murein mit Proteineinschlüssen überbrückt sein kann. Dies hätte zur Folge, daß das Protein PEp C nicht als langgestrecktes Molekül anzusehen ist.

4.2.3 Die äußere Membran (auch Backing Layer genannt)

Der Aufbau der äußeren Membran von *Deinococcus radiodurans* ist bildhaft in der Tafel 43 dargestellt.

Die Lipiddoppelschicht dieser Membran besteht vorwiegend aus Phosphoglycolipiden, Glycolipiden (Thompson, 1982) und Lipopolysacchariden (siehe 3.1.3.3 und 3.1.3.5). Die äußere Membranhälfte der äußeren Membran von Enterobakterien (z.B. *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*) wird nur aus Lipopolysacchariden aufgebaut (Mühlradt, 1976; Wicken und Knox, 1980 und Lugtenberg und Van Alphen, 1983). Eine derartige äußere Membran stellt für Enterobakterien eine wirksame Barriere gegen lipophile Stoffe (wie z.B. Antibiotika, Detergenzien (Cholate)) dar. Die negative Nettoladung der Lipopolysaccharidmoleküle, deren Wechselwirkung untereinander und deren hochgeordnete Struktur (Labischinski et al., 1985) tragen zu der geringeren Durchlässigkeit der Membran für hydrophobe Stoffe bei (Nikaido und Vaara, 1985).

Dieser Aufbau der äußeren Membran scheint für die Enterobakterien von Bedeutung zu sein. Da sie in einem Milieu leben, wo z.B. Detergenzien wie Cholate in hohen Konzentrationen vorliegen (Nikaido und Vaara, 1985). Für andersartige Bakterien dagegen mag dies von geringerer Bedeutung sein (Nikaido und Vaara, 1985).

Die äußere Membran besteht weiterhin aus zwei Hauptproteinen und sechs Nebenproteinen (siehe Tafel 43). Diese Proteine besitzen den Charakter von intrinsischen Membranproteinen (siehe 3.2.4.2.3 und 3.2.6) und sind nur mit Detergenzien aus der Membran solubilisierbar (siehe 3.2.4). Es liegt kein Hinweis vor, der für eine direkte Wechselwirkung dieser Proteine der äußeren Membran mit dem Murein spricht. Protein-Protein-Wechselwirkungen können eventuell indirekt über PEp C (Bestandteil des Intercalating Material) mit den Proteinen der äußeren Membran stattfinden (siehe 3.2.4 und Tabelle 23 A und B). Eine starke Protein-Protein-Wechselwirkung liegt zwischen der Innenseite des HPI-Layers und den Proteinen der äußeren Membran. Der große Teil dieser Proteine kann mit DTSP mit der Innenseite des Layers vernetzt werden (siehe 3.2.3.2 und Tabelle 23). Die intensivste Wechselwirkung zum HPI-Layer haben PEp A und PEp K (siehe 3.2.1; 3.2.3 und 3.2.4). Laterale Protein-Protein-Wechselwirkungen in der äußeren Membran sind vorhanden. PEp A und PEp D bilden hauptsächlich Homodimere nach Vernetzung mit DTSP, aber auch Heterodimere (siehe 3.2.3.1.2). PEp K bildet Dimere und Trimere nach Vernetzung mit DTSP. Über weitere Protein-Protein-Wechselwirkungen anderer Nebenproteine der äußeren Membran kann keine Aussage gemacht werden, aber sie können nicht ausgeschlossen werden (siehe 4.2.1). Membrangebundene Enzymaktivitäten wurden für das PEp A-Protein als (3'→5')-Exonuclease, für das PEp D-Protein als 5'-Nucleotidase (siehe 3.2.7) und schließlich für das PEp P-Protein als Proteinase (siehe Emde-Kamola, 1985) nachgewiesen. Das Vorkommen des PEp A-Proteins als Dimer

nach einer Vernetzung mit DTSP (siehe 3.2.3.1.2) in der Pink Envelope wird unterstützt durch experimentelle Daten von Mitchel (1978). Der Autor isolierte das Enzym in Anwesenheit des Detergens Natriumdeoxycholat als ein enzymatisch aktives Dimer mit einem apparenten Molekulargewicht von 260 kD aus dem "middle cell wall layer" (es entspricht ungefähr der Pink Envelope).

Ionische Wechselwirkungen scheinen für einige der Proteine aus der äußeren Membran von Bedeutung zu sein. Die Membranproteine PEp G und PEp J können beide effizienter mit Detergenzien und Begleitionen aus der Membran solubilisiert werden (siehe 3.2.4 und Tabelle 23 B).

Die Abbildung in Tafel 43 zeigt alle Proteine der äußeren Membran als Transmembranproteine. Diese Vorstellung stützt sich einerseits auf experimentelle Beobachtungen in dieser Arbeit und andererseits auf eine theoretische Überlegung, entnommen aus der Literatur. Die Argumente sind folgende:

a) Bei der Gefrierätzung von ganzen Bakterienzellen sind Bruchflächen im Innern der äußeren Membran nicht vorhanden (siehe 3.1.1). Dieser Befund weist auf einen hohen Gehalt an Transmembranproteinen hin (Lugtenberg und Van Alphen, 1983).

b) Die theoretische Überlegung von Henderson (1979) besagt, daß es schwer vorstellbar ist, daß ein Membranprotein als energetisch stabiles semi-integrales Protein existiert.

Die Proteine der äußeren Membran liegen offenbar nicht supramolekular geordnet in der Membran vor. Die Oberfläche der äußeren Membran mit Metallbedampfung (siehe Tafel 37) und nach Gefrierätzung (siehe Tafel 9) liefert keinen Hinweis auf kristalline Strukturen. Die gleiche Beobachtung wurde für die äußere Membran von *Escherichia coli* gemacht (Lugtenberg und Van Alphen, 1983).

4.2.4 Der S-Layer (auch HPI-Layer genannt)

Die Struktur des HPI-Layer-Proteins ist in der Abbildung der Tafel 43 schematisch wiedergegeben. Daten aus der dreidimensionalen Rekonstruktion des Moleküls (Baumeister et al., 1985) lagen für die bildhafte Wiedergabe des Layers zugrunde.

Der zweidimensionale Proteinkristall ist das am besten untersuchte Protein von *Deinococcus radiodurans*. Seine Lokalisierung in der Pink Envelope war aus früheren elektronenmikroskopischen Untersuchungen unter Verwendung von Ultradünnschnitten, Gefrierätzungen und Metallbedampfungen bekannt (siehe 1.2). Der Layer bedeckt die gesamte Außenfläche des Bakteriums (Emde, 1980). Er besteht aus einem Polypeptid mit einem apparenten Molekulargewicht von 108 kD, welches auf einem hexagonalen Gitter angeordnet ist (siehe 1.4). Die Einheitszelle besteht aus sechs identischen Polypeptiden (siehe auch 1.4). Die STEM-Massenkartierung ergab jeweils ein apparentes Molekulargewicht von 70 kD für die "core"-Region und 35 kD für die "spoke"-Region des Polypeptids. Der HPI-Layer bildet ein relativ offenes Netzwerk mit einer trichterförmigen Pore auf der Außenseite und "Rosetten" (Innendurchmesser ca. 4 bis 6 nm (Baumeister et al., 1981; Engel et al., 1982)), die durch die "spokes" abgegrenzt sind (siehe 1.4). Das Protein ist dem S-Layer zuzuordnen (Sleytr und Messner, 1983). Im Rahmen dieser Arbeit ergaben sich keine Hinweise dafür, daß das HPI-Layer-Protein ein Glycoprotein ist.

Der HPI-Layer dissoziiert in Anwesenheit von SDS und EDTA schon bei einer Temperatur von 60°C in seine Bestandteile (Karrenberg, 1981). Die Beobachtung, daß EDTA (als unspezifischer Ionenfänger), kombiniert mit dem Detergens SDS die Dissoziationstemperatur herabsetzt, unterstreicht die Bedeutung von divalenten Kationen für die Wechselwirkung der einzelnen Untereinheiten im Gitter. Zweiwertige Kationen

sind häufig essentiell für den Zusammenbau solcher Proteinmoleküle im Gitter bakterieller S-Layer (Koval und Murray, 1985).

Der HPI-Layer konnte nicht mit Hilfe milder Detergenzien wie MEGA-10, Triton X-114, LDAO und SB-12 aus der Zellwand isoliert werden (siehe Tabelle 23 B). Die Proteolyse des HPI-Layer-Proteins bleibt morphologisch latent und beeinträchtigt nicht die physikalische Struktur des Layers (Rachel et al., 1983). Die häufig beobachtete Assoziation des HPI-Layers mit Murein bzw. Murein-Sacculi nach einer SDS-Extraktion von Zellwänden (mit Anwesenheit des Mureins) stellt keinen *in situ* Zustand dar (siehe 3.2.2). Dieses Phänomen wird auf eine unspezifische Adsorption zwischen der Oberfläche der Murein-Sacculi und der des Layers interpretiert. Solche Artefakte in Anwesenheit von Detergenzien wurden häufig für Poren-Proteine(z.B. Omp F aus *Escherichia coli*) beschrieben (Rosenbusch et al., 1980; Lugtenberg und Van Alphen, 1983).

Die Innenseite des HPI-Layers weist starke Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Proteinen der äußeren Membran auf (siehe 3.2.4 und Tabelle 23). Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, daß nach Behandlung der Pink Envelope mit milden Detergenzien (MEGA-10, Triton X-114, LDAO und SB-12) der HPI-Layer noch mit verschiedenen Proteinen der äußeren Membran assoziiert bleibt. Diese Proteine der äußeren Membran werden durch DTSP mit der Innenseite des HPI-Layers vernetzt (siehe 3.2.3.2 und Tabelle 23 A). Danach handelt es sich offenbar um hydrophobe Protein-Protein-Wechselwirkungen des HPI-Layers mit den Membranproteinen. Das HPI-Layer-Protein muß wohl über hydrophobe Domänen auf seiner Innenseite verfügen. Ob zusätzlich Protein-Lipid-Wechselwirkungen zwischen der inneren Oberfläche des Layers und der äußeren Fläche der äußeren Membran existieren, kann hier nicht beantwortet werden. Die Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen der

Innenseite des HPI-Layers und den darunter lokalisierten Proteinen der äußeren Membran können in zwei Bereichen des Layers stattfinden:

a) an der Innenseite der "core"-Region,

b) mit der unteren Oberfläche der "spokes"-Region.

Die Abbildung in der Tafel 43 läßt die genaue Lokalisierung und Kontaktstellen zwischen der Innenseite des Layers und den PEp-Membranproteinen offen.

Im Rahmen der topographischen Untersuchung ergab sich kein Hinweis für eine durch das geordnete Gitter determinierte spezifische Positionierung der Proteine in der äußeren Membran, d.h. der HPI-Layer scheint keine quasi spitaklische Ordnung in der äußeren Membran zu forcieren (siehe 3.2.3.2.1).

Die genaue Funktion des HPI-Layers bleibt unklar, wie allgemein alle übrigen bekannten S-Layer (Beveridge, 1980; Sleytr, 1978; Sleytr und Messner, 1983). Einige Vorstellungen über die mögliche Funktion des Layers wurde schon von Baumeister et al., 1982) beschrieben. Sie sollen hier in Kürze wiedergegeben werden:

a) Kontrolle der freien Diffusion von kleinen und mittelgroßen Molekülen (d.h. eine Poren-Funktion).

b) Rezeptor-Funktion

c) Schutzfunktion gegen potentiell lysierende Enzyme aus dem Lebensraum des Bakteriums.

d) Der HPI-Layer könnte dazu beitragen, verschiedene enzymatische Reaktionsabläufe in der äußeren Membran voneinander örtlich abzugrenzen. Es entspräche einer Art von Kompartimentierung.

4.2.5 Die Kohlenhydratkapsel (auch "capsular layer" genannt)

Diese äußerste morphologisch faßbare Schicht hat einen direkten Kontakt zu der Außenwelt des Bakteriums (siehe Tafel 43). Die Hauptkomponenten dieser Kapsel sind langkettige Zuckerpolymere (auch die meisten langkettigen Zuckerpolymeranteile der Lipopolysaccharide tragen zur Bildung der Kohlenhydratkapsel bei , deren Zusammensetzung weitgehend ungeklärt ist (Seltmann, 1982)). Die Zuckerpolymeren der Kohlenhydratkapsel sind vermutlich in der äußeren Membranhälfte verankert, möglicherweise über Glycolipide. Die Kohlenhydratkapsel läßt sich quantitativ mit Butanol (Emde, 1980; Karrenberg, 1981) und mit Detergenzien entfernen (siehe 3.2.4). Die Kapsel ist elektronenmikroskopisch nur mit Rutheniumrot-Fixierung darstellbar (Emde, 1980). Es ist vorstellbar, daß Exoproteine von der Kohlenhydratkapsel zurückgehalten und konzentriert werden.

4.3 Vergleich zwischen dem Proteinkatalog von *Deinococcus radiodurans* Sark und dem von *Escherichia coli*

Deinococcus radiodurans und *Escherichia coli* haben beide eine nahezu gleiche Anzahl an Hauptproteinen in der Zellwand (siehe Tabelle 24); allerdings liegen die apparenten Molekulargewichte der PEp-Proteine (47 kD bis 120 kD) erheblich höher als die der Omp-Proteine (siehe Tabelle 24). Das Bakterium *Deinococcus radiodurans* nimmt insofern eine besondere Stellung ein, als die apparenten Molekulargewichte der bekannten Omp-Proteine Gram-negativer Bakterien übereinstimmend zwischen 7 kD und 50 kD liegen (z.B. *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* (Lugtenberg und Van Alphen, 1983); *Rhodopseudomonas sphaeroides* (Baumgardner et al., 1980); *Chromatium vinosum* (Lane und Hurlbert, 1980); *Legionella pneumophila* (Gabey et al., 1985);

Pseudomonas aeruginosa (Mizuno und Kageyama, 1979); *Vibrio parahaemolyticus* (Koga und Kawata, 1983)).

Ein Vergleich der Funktionen der Hauptproteine (siehe Tabelle 24) zeigt, daß alle *Escherichia coli*-Proteine außer Omp A und das Lipoprotein eine Poren-Funktion ausüben. Diese Moleküle bilden hydrophile Kanäle durch die äußere Membran (Nikaido und Vaara, 1985). Keines dieser Proteine besitzt eine enzymatische Funktion. Hingegen sind zwei der PEp-Hauptproteine, PEp A und PEp D, Enzyme: PEp A eine (3'→5')-Exonuclease und PEp D eine 5'-Nucleotidase. Die Proteine PEp B und PEp C sind funktionell nicht näher charakterisiert (siehe auch 4.2.3). Der Vergleich der Nebenproteine dieser beiden Bakterien (siehe Tabelle 25) zeigt, daß auch hier die Anzahl für *Deinococcus radiodurans* und *Escherichia coli* in etwa die gleiche ist. Weitere Nebenproteine der äußeren Membran (hier nicht in der Tabelle 25 vermerkt) von *Escherichia coli* wurden charakterisiert: eine Phospholipase A1, eine Proteinase (Nikaido und Vaara, 1985) und eine Leader-Peptidase (Zwizinsky et al., 1981). Alle in der Tabelle 25 vorgestellten Nebenproteine aus *Escherichia coli* sind Poren-Proteine mit spezifischen Kanälen für bestimmte Moleküle und Ionen. Die PEp-Nebenproteine sind funktionell nicht näher charakterisiert, außer PEp P, einer membrangebundenen Proteinase (siehe Emde-Kamola, 1985). Die apparenten Molekulargewichte der PEp-Nebenproteine liegen in einem niedrigeren Bereich: 20 kD bis 43 kD, verglichen mit den Omp-Nebenproteinen von *Escherichia coli*: 26 kD bis 83 kD.

Allgemein zeigen die Vergleiche von Haupt- und Nebenproteinen dieser beiden Bakterienarten, daß

a) die apparenten Molekulargewichte sich erheblich unterscheiden,

b) die Omp-Proteine aus *Escherichia coli* arm an enzymatischen Funktionen sind und vorwiegend Poren-Funktion

PEp-Protein	Hauptproteine aus *Deinococcus radiodurans* Sark		Omp Protein	Hauptproteine aus *Escherichia coli* K-12	
	MGapp (kD)	Funktion		MG (kD) (1)	Funktion (2)
PEp A	120	(3'→5')-Exonuclease	Omp C	38.3	nicht spezifische Poren-Proteine
PEp B	108	n.d.	Omp F	37.2	
PEp C	64	n.d.	Pho E	36.8	
PEp D	47	5'-Nucleotidase	Omp A	35.1	n.d.
			Lipo-protein	7.2	Stabilisierung der Zw

Tabelle 24: Vergleich zwischen den Hauptproteinen der äußeren Zellwand aus *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* K-12
(1) Daten entnommen aus Lugtenberg und Van Alphen (1983)
(2) Daten entnommen aus Nikaido und Vaara (1985)
Abkürzungen: MGapp = apparentes Molekulargewicht, n.d. = nicht vermittelt, Zw = Zellwand

PEp-Protein	Nebenproteine aus *Deinococcus radiodurans* Sark		Omp Protein (*)	Nebenproteine aus *Escherichia coli* K-12	
	MGapp (kD)	Funktion		MGapp (kD) (1)	Funktion(1 und 2)
PEp E	43	n.d.	83 K	83	Aufnahme von Fe^{3+}?
PEp F	40	n.d.	Fep A	81	Aufnahme von Fe^{3+} Enterocholin
PEp G	35	n.d.	Fec	80.5	Aufnahme von Fe^{3+} Citrat
PEp H	34	n.d.	Ton A	78	Aufnahme von Fe^{3+} Ferrichrom
PEp I	33	n.d.	Cir	74	Aufnahme von komplexiertem Fe^{3+}?
PEp J	29	n.d.	But B	60	Aufnahme von Vitamin B 12
PEp K	20	n.d.	Lam B	47.4	Aufnahme von Maltose und Maltodextrin
PEp P	30	Proteinase (3)	Phage T6 Rezeptor (Tsx)	26	Aufnahme von Nucleosid und Deoxynucleosid

Tabelle 25: Vergleich zwischen den Nebenproteinen der äußeren Zellwand aus *Deinococcus radiodurans* Sark und *Escherichia coli* K-12
(1) Daten entnommen aus Lugtenberg und Van Alphen (1983)
(2) Daten entnommen aus Nikaido und Vaara (1985)
(3) Daten entnommen aus Emde (1985)
Abkürzungen: MGapp = apparentes Molekulargewicht
n.d. = nicht ermittelt
(*) Diese Proteine haben eine spezifische Poren-Funktion (Lugtenberg und Van Alphen (1983)

aufweisen. *Deinococcus radiodurans* dagegen besitzt einige Hauptproteine mit enzymatischen Funktionen.

c) Die beiden Bakterien besitzen Proteinasen als Nebenproteine in den äußeren Zellwandschichten.

4.4 Vergleich der molekularen Architektur der äußeren Zellwände von *Deinococcus radiodurans* Sark und *Escherichia coli*

In der letzten Dekade ist eine Vielzahl von Modellen bakterieller Zellwände erarbeitet worden. In dieser Zeitspanne wurden durch Verwendung neuartige experimentelle Techniken detaillierte Modellvorstellungen erarbeitet. Erwähnt sei hier das Modell einer Gram-negativen Bakterienzellwand von Leive (1974). Ein Jahr später präsentieren Smit et al. (1975) ein modifiziertes Modell. Alle darauf folgenden Modelle basieren weitgehend auf den beiden zuletzt genannten: z.B. für *Escherichia coli* (DiRienzo et al., 1978; Lugtenberg und Van Alphen, 1983) und für *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* Nikaido und Nakae, 1979; Osborn und Wu, 1980; Nikaido und Vaara, 1985). Als Zellwandmodell von *Escherichia coli* für den Vergleich mit *Deinococcus radiodurans* Sark (siehe Tafel 43 und 44) können nur die Modelle von Lugtenberg und Van Alphen(1983) und von Nikaido und Vaara (1985) herangezogen werden. Beide berücksichtigen die Tatsache, daß die Poren-Proteine Omp C, Omp F und Pho E nicht mit dem Murein in Verbindung stehen (siehe Tafel 44).

Der Vergleich mit der Architektur von *Deinococcus radiodurans* Sark bezieht sich auf die äußeren Zellwandschichten (d.h. auf den Zellwandteil oberhalb des Mureins). Die Morphologie der äußeren Zellwände beider Bakterien ist nahezu gleich, außer daß das Bakterium *Deinococcus radiodurans* eine zusätzliche Zellwandschicht besitzt, nämlich den S-Layer.

4.4.1 Das Intercalating Material von *Deinococcus radiodurans* Sark und die Mittelschicht von *Escherichia coli*

Zunächst sollten diese zwei zu vergleichenden Zellwandschichten näher definiert werden. Der periplasmatische Raum ist per Definition die Zwischenschicht, die die cytoplasmatische Membran mit dem darüberliegenden Murein verbindet (siehe auch Tafel 1). Die Mittelschicht (hier Intercalating Material genannt) ist per Definition die Zwischenschicht, die das Murein von der darüberliegenden äußeren Membran abtrennt (siehe auch Tafel 1). Diese Definition von Zellwandschichten ist eine schematische Darstellung des Aufbaus der Prokaryontenzellwand, aus elektronenmikroskopischen Bildern entnommen (siehe Drews und Giesbrecht, 1981). Abweichend davon bezeichnen Lugtenberg und Van Alphen (1983) die Mittelschicht oberhalb des Mureins als periplasmatischen Raum.

Das Intercalating Material von *Deinococcus radiodurans* und die Mittelschicht aus *Escherichia coli* sind morphologisch gesehen gleichwertig. Beide Zellwandschichten bestehen vorwiegend aus Proteinen (siehe Tafel 43 und 44). Die Überbrückung der Mittelschicht und damit die Verbindung zwischen dem Murein und der äußeren Membran wird bei *Escherichia coli* durch ein Protein bewerkstelligt, nämlich durch das Lipoprotein. Dieses Protein ist zum Teil kovalent an das Murein gebunden (durch das Lysin des C-Terminus (Braun, 1975)) und durch seinen hydrophoben Lipidanteil (kovalent gebunden an das Cystein des N-Terminus (Braun, 1975)) mit der inneren Hälfte des Bilayers in Wechselwirkung. Das Lipoprotein ist überwiegend α-helical. Verschiedene dreidimensionale Modelle wurden für das Molekül vorgeschlagen (Braun, 1975; Inouye, 1974). Die Hauptfunktion des Proteins ist eine Versteifung der Zellwandform und damit eine Strukturstabilisierung, indem es als Distanzstück zwischen dem Murein und der äußeren Membran fungiert. Andersartige Lipo-

proteine wurden sowohl bei *Escherichia coli* (in geringerer Anzahl) als auch bei *Pseudomonas aeruginosa* gefunden (Lugtenberg und Van Alphen, 1983).

Das Protein von *Deinococcus radiodurans*, das dem Lipoprotein am nächsten kommt, ist PEp C. Es ist das Hauptprotein des Intercalating Materials, es hat Kontakt sowohl zum Murein (siehe 3.2.2) als auch vermutlich zu der äußeren Membran (siehe 3.2.4.5 und Tafel 43), und es könnte demnach die gleiche stützende Funktion des Lipoproteins in der Zellwand übernehmen. Ob PEp C ein Lipoprotein mit einem hohen α-helicalen Strukturanteil ist, bleibt offen. Interessant ist die Beobachtung, daß das Lipoprotein (gebundene Form) von *Escherichia coli* nicht mit Vernetzungsreagenzien mit den darüberliegenden Poren-Proteinen (wie Omp C und Omp F) der äußeren Membran vernetzt wird. Der Grund ist möglicherweise darin zu suchen, daß die meisten Aminogruppen (potentielle reaktive Gruppen für Vernetzungen) sich bei den Poren-Proteinen in den Poren befinden und demnach sterisch unzugänglich für eine Vernetzung sind (Lugtenberg und Van Alphen, 1983). Es sei daran erinnert, daß PEp C nach einer Vernetzung mit DTSP nicht eindeutig mit den Proteinen der äußeren Membran vernetzbar ist (siehe 3.2.3.2). Das Protein Omp A von *Escherichia coli* wird als ein Transmembranprotein, das in Wechselwirkung mit dem Murein steht, beschrieben (siehe Tafel 44). *Deinococcus radiodurans* zeigt keinen Hinweis für ein solches Protein. PEp E und PEp F sind Nebenproteine des Intercalating Materials, deren Funktion bzw. strukturelle Bedeutung bleiben unklar. Erwähnenswert ist, daß PEp E eine starke Wechselwirkung mit dem Murein hat (siehe 3.2.2 und Tafel 43).

4.4.2 Die äußere Membran von *Deinococcus radiodurans* Sark und von *Escherichia coli*

Einige Proteine der äußeren Membran von *Escherichia coli* sind Poren-Proteine (Omp C, Omp F, Pho E und Lam B; siehe Tabelle 24), die als Transmembranproteine in der Lipiddoppelschicht verankert sind und mit den Lipopolysacchariden in Wechselwirkung stehen (Lugtenberg und Van Alphen, 1983). Die Poren-Proteine sind in der Membran in Form von Trimeren angeordnet. Keines der Poren-Proteine aus *Escherichia coli* hat eine Wechselwirkung mit dem Murein (siehe Tafel 44), lediglich Omp A, dessen Funktion noch unklar ist (Lugtenberg und Van Alphen, 1983). Ein Protein der äußeren Membran, das in Wechselwirkung mit dem Murein steht, wurde bei *Deinococcus radiodurans* Sark nicht identifiziert. Alle bis jetzt gut untersuchten Poren-Proteine sind reich an ß-Struktur (Lugtenberg und Van Alphen, 1983; Nikaido und Vaara, 1985). Das strukturell am besten aufgeklärte Poren-Protein Omp F aus *Escherichia coli* BE hat einen ß-Strukturanteil von mehr als 60 % (Rosenbusch et al., 1980; Kleffel et al., 1985). Hinweise für ß-Struktur liegen auch für Proteine der Pink Envelope vor (siehe 3.1.3.5.4). Die Tafel 44 zeigt, daß die äußere Membranhälfte von *Escherichia coli* nur aus Lipopolysacchariden besteht. Die Kohlenhydratkomponenten dieser Moleküle ragen von der Zelloberfläche in das umgebende Außenmilieu des Bakteriums. Sie bilden die letzte strukturell organisierte Schicht der äußeren Zellwand. Die Lipopolysaccharide bei Enterobakterien sind negativ geladen in der "core"-Lipid-A-Region, diese Moleküle sind miteinander in der äußeren Membranhälfte über positiv geladene bivalente Liganden (vor allem über Mg^{++}- und Ca^{++}-Ionen) verknüpft (Nikaido und Vaara, 1985). Eine zusätzliche Kohlenhydratkapsel kann bei *Escherichia coli* unter bestimmten Bedingungen gebildet werden (Seltmann, 1982).

Deinococcus radiodurans besitzt zusätzlich einen S-Layer (HPI-Layer) auf der äußeren Membran; dieser stellt quasi

ein peripheres Membranprotein mit einer relativ offenen zweidimensional kristallinen Struktur dar.

Die Intensität und Schichtdicke der Bedeckung des Bakteriums *Deinococcus radiodurans* mit einer Kohlenhydratkapsel variiert von Stamm zu Stamm. Sie ist bei dem Stamm R_1 intensiver und dichter als bei Sark (siehe 3.1.1 und 3.1.3.4). Die Kohlenhydratkapsel ist höchstwahrscheinlich in der äußeren Hälfte der äußeren Membran verankert (siehe 4.2.4).

4.5 Mögliche Funktionen der Pink Envelope und Überlegungen zur Bedeutung der PEp A- und PEp D-Proteine für das Bakterium

4.5.1 Überlegung zur Funktion der Pink Envelope

Die Pink Envelope umfaßt die äußersten Zellgrenzschichten des Bakteriums und steht in unmittelbarem Kontakt mit der Umwelt. Diese Envelope stellt sich als ein komplexes System von Makromolekülen dar, das vielfältige Funktionen zu erfüllen hat, u.a. Schutz-, Filter- und Erkennungsfunktionen.

Der HPI-Layer kann möglicherweise eine Schutzfunktion gegen lysierende Enyzme aus der Außenwelt übernehmen (siehe 4.2.3). Die Filterfunktion sollte vor allem der äußeren Membran der Pink Envelope als letzte abgrenzende Membranschicht des Bakteriums zur Umwelt zugeordnet werden. Die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien stellt im allgemeinen eine wirksame Diffusionsbarriere für viele Stoffe dar (Inouye, 1979). Diese Funktion ist physiologisch von Bedeutung. Das Bakterium ist darauf angewiesen, Nahrungsstoffe aus seiner Umgebung aufzunehmen und aufzuschließen. Dazu benötigt es eine enzymatische Maschinerie, die sich vorwiegend aus hydrolysierenden Enzymen zusammensetzt (z.B. Phosphatasen, Glycosidasen, Nucleasen, Proteinasen, Lipasen) (Inouye, 1979). Diese Enzyme dienen dazu, Makromoleküle oder niedermoleku-

lare organische Komponenten als Metaboliten zu verwenden. Bei Gram-negativen Bakterien sind diese hydrolysierenden Enzyme zum großen Teil im periplasmatischen Raum lokalisiert (DiRienzo et al., 1978; Lugtenberg und Van Alphen, 1983). Die Hydrolyseprodukte werden zu den spezifischen Transportasen und Rezeptoren an der cytoplasmatischen Membran weiter geleitet (Drews und Giesbrecht, 1981). Um diesen Transportweg für Metaboliten ins Zellinnere zu gewährleisten, müssen zuerst diese Stoffe durch die äußere Membran transportiert werden. Der Transport von Metaboliten durch die äußere Membran wurde am intensivsten bei den Enterobakterien (z.B. *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*) untersucht (Nikaido und Vaara, 1985). Deren äußere Membran besitzt spezifische und unspezifische hydrophile Kanäle (Poren-Proteine genannt). Diese Poren haben im Durchschnitt einen Durchmesser von ca. 1.1 bis 2 nm und erlauben durch erleichterte Diffusion (für die Definition siehe Schlegel, 1981) den Transport von Molekülen (mit einem Molekulargewicht kleiner als 600 Daltons) und Ionen durch die äußere Membran. Die einfache Diffusion von lipophilen Stoffen über die äußere Membran wird bei den Enterobakterien vor allem durch die Lipopolysaccharide wirksam verhindert (Nikaido und Vaara, 1985). Der HPI-Layer ist wegen seiner offenen Struktur in der Lage, möglicherweise den Transport von Molekülen durch einfache Diffusion zu gewährleisten. Die Molekülgröße vor allem wäre für diese unspezifische Diffusion maßgebend.

Einige Nebenproteine der äußeren Membran von Enterobakterien (siehe auch Tabelle 25 in 4.4) zeigen eine Erkennungsfunktion für Bakteriophagen und Bactericine an der Zelloberfläche (Drews und Giesbrecht, 1981). Ebenso könnten einige Proteine der Pink Envelope eine derartige Funktion haben.

4.5.2 Überlegung zur Bedeutung von PEp A- und PEp D-Proteinen für das Bakterium

Die topographische Analyse der äußeren Membran zeigt, daß die in vielen Kopien vorhandenen Proteine PEp A und PEp D nahe benachbart sind (siehe 3.2.3.1.2). Diese Proteine sind Nucleinsäuren hydrolysierende Enzyme (PEp A als (3'→5')-Exonuclease und PEp D als 5'-Nucleotidase) mit sich ergänzenden Abbaufunktionen (siehe 3.2.7 und Tafel 45). DNA und RNA-Einzelstränge (Gentner und Mitchel, 1975) aus dem Außenmilieu des Bakteriums können mit Hilfe beider Enzyme bis zu Nucleosiden und Phosphat abgebaut werden. Die Bedeutung der Enzyme könnte also darin liegen, Nucleinsäuren dem Stoffwechsel in Form von niedermolekularen Bausteinen verfügbar zu machen. Dafür ist das Vorhandensein der 5'-Nucleotidase, die die anfallenden Nucleotide entphosphoryliert, von Bedeutung. Die Nucleotide (etwa AMP) würden sonst den Adenylatpool und damit den Energieladungszustand ("energy-charge") (Schlegel, 1981) beeinflussen und die regulatorische Balance zwischen katabolischen und anabolischen Reaktionen stören. Die Nucleotide und Phosphate (siehe Tafel 45) müssen die äußere Membran passieren, um von der Zelle aufgenommen werden zu können. Der erleichterte Transport solcher Metaboliten über die äußere Membran müßte durch geeignete Poren-Proteine geschehen (siehe 4.5.1). Das Vorhandensein von Poren für PEp-Proteine der äußeren Membran ist theoretisch denkbar. Die gut charakterisierten Poren-Proteine der äußeren Membran von Enterobakterien zeigen, daß deren funktionelle Einheiten aus Trimeren bestehen (Lugtenberg und Van Alphen, 1983; Nikaido und Vaara, 1985). Vor kurzem wurden funktionelle Einheiten von Poren-Proteinen in Form von Dimeren bei *Rhodopseudomonas capsulata* (Flamman und Weckesser, 1984), bei *Rhodopseudomonas sphaeroides* (Weckesser et al., 1985) und *Paracoccus dinitrificans* (Zalman und Nikaido, 1985) beschrieben. PEp A, PEp D und PEp K liegen offenbar als Dimere in der äußeren Membran vor

(siehe 3.2.3.1.2 und 4.2.2).Demnach könnten diese Proteine Poren-Funktionen übernehmen.

Zwei Möglichkeiten können für den Transport von Metaboliten, gewonnen nach dem Abbau von Nucleinsäure (s.o.), unterschieden werden:

a) PEp K oder andere PEp-Proteine außer PEp A und PEp D können für solche Metaboliten die Poren-Funktionen übernehmen.

b) PEp A und PEp D könnten theoretisch selbst als Poren-Protein für diese Metaboliten fungieren, wenn die Katalyse vektoriell von außen nach innen, d.h. durch die Membran (vor allem für PEp D) abläuft. Allerdings muß zu dieser Hypothese angemerkt werden, daß bis jetzt keines der charakterisierten Poren-Proteine aus anderen Bakterien eine Doppelfunktion ausübt (d.h. zusätzlich als Enzym fungiert) (Lugtenberg und Van Alphen, 1983; Nikaido und Vaara, 1985). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang noch, daß *Escherichia coli* ein Nucleosid-spezifisches Poren-Protein als Nebenprotein der äußeren Membran besitzt (Nikaido und Vaara, 1985). Es handelt sich um das Tsx-Protein, auch T6-Phagen-Rezeptorprotein genannt. *Pseudomonas aeruginosa* bildet ein Poren-Protein Omp P, das spezifisch für die Aufnahme von Anionen (u.a. Phosphationen) ist.

Bezüglich der bemerkenswerten Strahlenresistenz von *Deinococcus radiodurans* (siehe Dertinger und Jung, 1969 und Kushner, 1978) ist es möglich, daß die effiziente Reparatur der Schäden an der DNA (durch das SOS-System, siehe Kenyon, 1983) von den Enzymen der äußeren Membran unterstützt wird, indem fremde Nucleinsäuren in Nucleoside zerlegt und diese für die Reparatur der zelleigenen DNA zur Verfügung gestellt werden. Dies würde einen außerordentlich

positiven Beitrag zur Energiebilanz der Zelle liefern. Diese Vorstellung wird durch die experimentellen Daten von Mitchel (1975, 1978, 1979, 1981) unterstützt. Der Autor beobachtete, daß das Bakterium unter Bestrahlung aktive (3'→5')-Exonuclease-Monomere (PEp A-Protein),vermutlich begleitet von Lipopolysacchariden, in das Außenmilieu sezerniert. Interessant ist, daß unter Streßbedingungen anderer Art (z.B. Inkubation der Bakterien 24 Stunden lang in Phosphatpuffer) die Zellen zahlreiche Vesikel von der äußeren Membran nach außen hin abschnüren. Diese Vesikel enthalten nach Untersuchungen mit der SDS-PAGE vorwiegend zwei Proteine: PEp A und PEp P (die Proteinase) (siehe Emde-Kamola, 1985). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die äußere Membran in die Reaktion der Zelle auf Streßeinflüsse involviert ist.

4.6 Zusammenfassung

Katalog der Pink Envelope-Proteine (R_1 und Sark)

1. Die Herstellung von Pink Evelope-Präparationen aus *Deinococcus radiodurans* wurde standardisiert. Die Reinigung der Pink Envelope von cytoplasmatischen Membranresten wurde mit Hilfe des Detergens Triton X-100 erreicht. Die membrangebundene Proteinase der äußeren Membran wurde erfolgreich mit PMSF inhibiert.

2. Die Proteine der Pink Envelope (Stamm R_1 und Sark) wurden katalogisiert. Der beiden Stämmen gemeinsame Katalog besteht aus vier Hauptproteinen mit apparenten Molekulargewichten von 120 kD bis 47 kD und acht Nebenproteinen mit apparenten Molekulargewichten von 43 kD bis 20 kD.

3. Drei Proteinen kann eine enzymatische Aktivität zugeordnet werden. Das PEp A-Protein ist eine (3'→5')-Exonucle-

ase, das PEp D-Protein ist eine 5'-Nucleotidase und das PEp P-Protein ist eine Proteinase.

4. Homologiestudien der PEp-Proteine mit P ptide Mapping-Methoden zeigten, daß die PEp-Proteine vom Stamm R_1 und Sark homolog sind. Die Untersuchung der HPI-Monomere von R_1 und Sark zeigte eine weitgehende, wenn auch nicht vollständige Homologie.

5. Die Infrarot-spektroskopischen Untersuchungen zeigten, daß die PEp-Proteine einen relativ hohen ß-Strukturanteil besitzen.

6. Das Vorhandensein von Lipopolysacchariden bei *Deinococcus radiodurans* (R_1 und Sark) konnte anhand der KDO-Bestimmung nachgewiesen werden.

Die Topographie der PEp-Proteine von *Deinococcus radiodurans* Sark

7. Für PEp C, PEp E und PEp F wurde eine Wechselwirkung mit dem Murein nachgewiesen. PEp C und PEp E können als "Murein-assoziierte Proteine" klassifiziert werden.

8. Durch reversible chemische Vernetzung der Pink Envelope mit dem Vernetzer DTSP wurden die Nachbarschaftsbeziehungen der PEp-Proteine untersucht. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

   a) PEp A, PEp D und PEp K vernetzten zu Homodimeren. PEp K kann in geringerem Maße zu Homotrimeren vernetzen. Heterodimere von PEp A mit PEp D wurden beobachtet.

   b) Zwei Hauptproteine PEp A und PEp D sowie vier Nebenproteine PEp G, PEp H, PEp I und PEp K vernetzten mit dem HPI-Layer, wobei PEp A mengenmäßig am häufigsten mit dem Layer vernetzt war.

9. Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Metallbedampfungen zeigten, daß die mit DTSP vernetzten PEP-Proteine sich ausschließlich auf der Innenseite des HPI-Layers befinden.

10. Extraktionsexperimente von Proteinen mit milden Detergenzien (MEGA-10, Triton X-114, LDAO, SB-12) an ganzen Bakterien und Pink Envelope-Präparationen ergaben folgende Resultate:

    a) PEp C und PEp F werden bevorzugt mit Detergenzien plus Begleitionen isoliert. PEp C, PEp E und PEp F konnten aber auch ausschließlich durch hohe Ionenstärke (0.2 M KCl) solubilisiert werden.

    b) PEp A, PEp D, PEp G, PEp H, PEp J und PEp K können dagegen nur mittels Detergenzien extrahiert werden.

    c) Stabile Protein-Protein-Wechselwirkungen einiger PEp-Proteine mit dem HPI-Layer konnten nachgewiesen werden.

    d) Kondensationsexperimente mit dem Detergens Triton X-114 zeigten, daß PEp A, PEp D, PEp J und PEp K als intrinsische und PEp C, PEp F und PEp G als periphere Membranproteine einzuordnen sind.

11. Hydrophobizitätsberechnungen der vier PEp-Hauptproteine auf der Basis von Aminosäurenanalyse ergaben in jedem Fall niedrige Z-Werte. Dies scheint ein gemeinsames Merkmal von Proteinen aus äußeren Bakterienmembranen zu sein, obwohl es sich aufgrund anderer Befunde eindeutig um Transmembranproteine handelt. Für keinen der proteolytischen Spaltfragmente des HPI-Layers ergab sich aufgrund dieser Berechnungen ein hydrophober Charakter.

12. Die (3'→5')-Exonuclease (PEp A-Protein) und die 5'-Nucleotidase (PEp D-Protein) konnten an der Oberfläche der äußeren Membran lokalisiert werden.

13. Auf der Basis der verschiedenen experimentellen Befunde wurde ein Modell für die molekulare Architektur der Pink Envelope vorgeschlagen. Es ergeben sich folgende topologischen Zuordnungen:

    a) Das Intercalating Material besteht aus einem Hauptprotein PEp C und zwei Nebenproteinen PEp E und PEp F.

    b) Die äußere Membran besteht aus zwei Hauptproteinen PEp A und PEp D sowie aus sechs Nebenproteinen PEp G, PEp H, PEp I, PEp P, PEp J und PEp K.

    c) Der HPI-Layer bildet ein offenes, zweidimensional kristallines Netzwerk, das über hydrophobe Wechselwirkungen mit der äußeren Membran (insbesondere der PEp A-Proteine) assoziiert ist.

6. Literaturverzeichnis

ALLEN, G., TRINNAMAN, B.J., GREEN, N.M. (1980) The primary structure of the calcium ion-transporting adenosine triphosphatase protein of rabbit skeletal sarcoplasmic reticulum. Peptides derived from digestion with cyanogen bromide, and the sequences of three long extramembranous segments. Biochem. J. 187, 591-616

ANDERSON, A.W., NORDAN, H.C., CAIN, R.F., PARRISH, G., DUGGAN, D. (1956) Studies on a radio-resistant *micrococcus*. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. Food Technol. (Chicago) 10, 575-582

ANDERSON, G.W., ZIMMERMANN, J.E., CALLAGHAN, F.M. (1964) The use of esters of N-hydroxysuccinimide in peptide synthesis. J. Am. Chem.Soc. 86, 1839-1842

ANDERSON, J.M. (1979) Structural studies on human spectrin. J. Biol. Biochem. 254, 939-944

ANGUS, B.L., HANCOCK, R.E.W. (1983) Outer membrane porin proteins F,P, and D1 of *Pseudomonas aeruginosa* and PhoE of *Escherichia coli*: chemical cross-linking to native oligomers. J. Bacteriol. 155, 1042-1051

BABEL, W., WACHTER, E., AQUILA, M., KLINGENBERG, M. (1981) Amino acid sequence determination of the ADP, ATP carrier from beef heart mitochondria. The sequence of the C-terminal acidolytic fragment. BBA 670, 176-180

BARRENTES, F.J. (1975) The nicotinic cholinergic receptor: different compositions evidenced by statistical analysis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 407-413

BARRETT, A.J. (1977) Proteinases in mammalian cells and tissues. In: Research Monographs in Cell and Tissue Physiology. Barret, A.J. (Ed.) Vol. 2. North-Holland Publishing Company. Amsterdam - New York - Oxford, 1977

BAUMEISTER, W, KÜBLER, O. (1978) Topographic study of the cell surface of *Micrococcus radiodurans*. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 75, 5525-5528

BAUMEISTER, W., KÜBLER, O., ZINGSHEIM, H.P. (1981) The structure of the cell envelope of *Micrococcus radiodurans* as revealed by metal shadowing and decoration. J. Ultrastruct. Res. 75, 60-71

BAUMEISTER, W., KARRENBERG, F., RACHEL, R., ENGEL, A., TEN HEGGELER, B., SAXTON, W.O. (1982) The major cell envelope protein of *Micrococcus radiodurans* (R_1). Structural and chemical characterisation. Eur. J. Biochem. 125,535-544

BAUMGARDNER,D., DEAL, C., KAPLAN, S. (1980) Protein composition of *Rhodopseudomonas sphaeroides* outer membrane. J. Bacteriol. 143, 265-273

BELLAMY, L.J. (1975) The Infrared Spectra of Complex Molecules. Chapman and Hall, London, 1975

BERGMEYER, H.U., BERNT, E. (1977) Farb-Test mit L.Lactat, NAD, Phenazimethosulphat und INT. In: Grundlagen der enzymatischen Analyse. Bergmeyer, H.U. (Ed.), S. 612-615, Verlag Chemie-Weinheim, New York, 1977

BEVERIDGE, T.J. (1981) Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. Int. Rev. Cytol. 72, 229-317

BIGELOW, C.C. (1967) On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. J. Theoret. Biol. 16, 187-211

BIOTRONIK (1981) Applicationsreport ASA.1981/2, München

BORDIER, C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in triton X-114 solution. J. Biol. Chem. 256, 1604-1607

BRAUN, V. (1975) Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. BBA 415, 335-377

BROOKS, B.W., MURRAY, R.G.E., JOHNSON, J.L., STACKEBRANDT, E., WOESE, C.F., FOX, G.E. (1980) Red pigmented Micrococci: a basis for taxonomy. Int. J. Syst. Bacteriol. 30 , 627-646

BROOKS, S.B.W., MURRAY, R.G.E. (1981) Nomenclature for *"Micrococcus radiodurans"* and other radiation-resistant cocci: Deinococcaceae fam. nov. and Deinococcus gen. nov, including five species. Int. J. Syst. Bacteriol. 31, 353-360

BROWN, W.E., HOWARD, G.C. (1983) Amino acid composition of proteins eluted from polyacrylamide gels: single hydrolysis method for all amino acids, including cystein and tryptophan. In: Methods in Enzymol. 91, 36-41. Hirs, C.H.W., Timasheff, S.N (Eds.), Academic Press, Inc., New York and London, 1983

BÜCHEL, D.E., GRONENBORN, B, MÜLLER-HIL, B. (1980) Sequence of the lactose permease gene. Nature (London) 283, 541-545

BURREL, A.D., FELDSCHREIBER, P. DEAN, C.J. (1971) DNA-membrane association and the repair of double breaks in x-irradiated *Micrococcus radiodurans*. BBA 247, 38-53

CANTOR, C.R., SCHIMMEL, P.R. (1980) Biophysical Chemistry. Part I. The Conformation of Biological Macromolecules. W.H. Freeman and Company. San Francisco, 1980

CAPALDI, R.A., VANDERKOOI, G. (1972) The low polarity of many membrane proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 930-932

CAPALDI, R.A. (1977) Membrane Proteins and their Interactions with Lipids. Marcel Dekker Inc. New York and Basel, 1977

CAPALDI, R.A., BRIGGS, H.M., SMITH, R.J. (1979) Cleavable bifuctional reagent for studying near neighbor relationships among mitochondrial inner membrane complexes. In: Methods in Enzymol. 56, 630-643. S. Fleischer and L. Parker (Eds.). Biomembranes, Part G. Bioenergetics, Biogenesis of Mitochondria, Organisation and Transport. Academic Press, Inc., New York and London, 1979

CHEN, R., SCHMIDTMAYR, W., KRÄMER, C., CHEN-SCHMEISSER, U., HENNING, U. (1980) Primary structure of major outer membrane protein II (ompA protein) of *Escherichia coli* K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4592-4596

CHEN, R., KRÄMER, C., SCHMIDMAYR, W., CHEN-SCHMEISSER, U., HENNING, U. (1982) Primary structure of major outer membrane protein I (ompF protein, porin) of *Escherichia coli* B/r. Biochem. J. 203, 33-43

CHOPRA, I., SHALES, S.W. (1980) Comparison of the polypeptide composition of *Escherichia coli* outer membranes prepared by two methods. J. Bacteriol. 144, 425-427

CHUA, N.H. (1980) Electrophoretic analysis of chloroplast proteins. In: Methods in Enzymol. 69, 434-446. Anthony San Pietro (Ed.). Photosynthesis and Nitrogen Fixation. Part C. Academic Press, Inc., New York and London, 1980

CLEMENT, J.M., HOFNUNG, M. (1981) Gene sequence of the λ receptor, an outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12. Cell. 27, 507-514

CLEVELAND, D.W., FISCHER, S.G., KIRSCHNER, M.W., LAEMMLI, U.K. (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 252, 1102-1106

COGGINS, J.R., HOOPER, E.A., PERHAM, R.N. (1976) Use of dimethyl suberimidate and novel periodate-cleavable bis (imido esters) to study the quaternary structure of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*. Biochem. 15, 2527-2535

COULTON, J.W., WAN, D.T.F. (1983) The outer membrane of *Haemophilus influenzae* type B: cell envelope associations of major proteins. Can. J. Microbiol. 29, 280-287

CUATRECASAS, P., PARIKH, W. (1972) Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose. Biochem. 11, 2291-2298

DAS, M., FOX, C. (1979) Chemical cross-linking in biology. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 8, 165-193

DEAN, C.J., FELDSCHREIBER, P., LETT, J.T. (1966) Repair of X-ray damage to the deoxyribonucleic acid in *Micrococcus radiodurans*. Nature (London) 209, 49-52

DIRIENZO, J.M., NAKAMURA, K., INOUYE, M. (1978) The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions. Ann. Rev. Biochem. 47, 481-532

DREWS, G. (1968) Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissenschaftler. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1968

DREWS, G. GIESBRECHT, P. (1981) Die Strukturelemente der Prokaryontenzelle. S. 471-541. H. Metzner (Ed.). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. Stuttgart, 1981

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350-356

DUGGAN, D.E., ANDERSON, A.W., ELLICKER, P.R., CAIN, R.F. (1959) Ultraviolet exposure studies on a gamma radiation restistant *Micrococcus* isolated from food. Food. Res. 24, 376-382

EAGLES, P.A.M., GILBERT, D.S., MAGGS, A. (1981) The polypeptide composition of neurofilaments from the marine worm *Myxicola infundibulum*. Biochem. J. 199, 89-100

EHRING, R., BEYREUTHER, K., WRIGHT, J.K., OVERATH, P. (1980) *In vitro* and *in vivo* products of *Escherichia coli* lactose permease gene are identical. Natur (London) 283, 537-540

EMDE, B. (1980) Strukturuntersuchungen an der Zellwand von *Micrococcus radiodurans*. Diplomarbeit. Universität Düsseldorf, 1980

EMDE, B., WEHRLI, E., BAUMEISTER, W. (1980) The topography of the cell wall of *Micrococcus radiodurans*. Eur. Congr. Electron Microscopy, Den Haag, Vol. II, 460-461, 1980

EMDE-KAMOLA, B. (1985) Isolierung und Charakterisierung einer Zellwandprotease von *Deinococcus radiodurans*. Dissertation. Universität Düsseldorf, 1985

ENGEL, A. (1978) Molecular weight determination by scanning transmission electron microscopy. Ultramicroscopy 3, 273-281

ENGEL, A., BAUMEISTER, W., SAXTON, W.O. (1982) Mass mapping of a protein complex with the scanning transmission electron microscope. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4050-4054

FAVA, A., ILICETO, A., CAMERA, E. (1957) Kinetics of the thiol-disulfide exchange. J. Am. Chem. Soc. 79, 833-838

FEICK, R., DREWS, G. (1978) Isolation and characterization of light harvesting bacteriochlorophyll. Protein complexes from *Rhodopseudomonas capsulata*. BBA 501, 409-513

FELGENHAUER, K. (1974) Evaluation of molecular size by gel electrophoretic techniques. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1281-1290

FLAMMANN, H.T., WECKESSER, J. (1984) Characterisation of the cell wall and outer membrane of *Rhodopseudomonas capsulata*. J. Bacteriol. 159, 191-198

FLAMMANN, H.T., WECKESSER, J. (1984) Porin isolated from the cell envelope of *Rhodopseudomonas capsulata*. J. Bacteriol. 159, 410-412

FORMANEK, H., FORMANEK, S., WAWRA, H. (1974) A three-dimensional atomic model of the murein layer of bacteria. Eur. J. Biochem. 46, 279-294

FOX, G.E., STACKEBRANDT, E., HESPELL, R.E., GIBSON, J., MANILOFF, J., DYER, T.A., WOLFE, R.S, BALCH, W.E., TANNER, R.S., MAGRUM, L.J., ZABLEN, L.B., BLAKEMORE, R., GUPTA, R., BONEN, L., LEWIS, B.J., STAHL, D.A., LUEHRSEN, K.R., CHEN, K.N., WOESE, C.R. (1980) The phylogeny of prokaryontes. Science 209, 457-463

FREITAG, H., NEUPERT, W., BENZ, R. (1982) Purification and characterization of a pore protein of the outer mitochondrial membran from *Neurospora crassa*. Eur. J. Biochem. 123, 629-636

FREYTAG, J.W., REYNOLDS, J.A. (1981) Polypeptide molecular weights of the (Na^+, K^+)-ATPase from porcine kidney medulla. Biochem. 20, 7211-7214

FRINGELI, U.P., GÜNTHARD, Hs.H. (1981) Infrared membrane spectroscopy. In: Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, Vol. XXXI: Membrane Spectroscopy. Grell, E. (ed.), 270-332. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1981

GABEY,J.E., BLAKE, M., NILES, W.D., HORWITZ, M.A. (1985) Purification of *Legionella pneumophila* major outer membrane protein and demonstration that it is a porin. J. Bacteriol. 162, 85-91

GELFI, C., RIGHETTI, P.G. (1981) Polymerisation kinetics of polyacrylamide gels. II. Effect of temperature. Electrophoresis 2, 220-228

GENTNER, N.E., MITCHEL, R.E.J. (1975) Ionizing radiation - induced release of a cell surface nuclease from *Micrococcus radiodurans*. Radiat. Res. 61, 204-215

GIBBONS, I.R., GRIMSTONE, A.V. (1960) On flagellar structure in certain flagellates. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 697-704

GIRARD, A.E. (1971) A comparative study of the fatty acids of some micrococci. Can. J. Microbiol. 17, 1503-1508

GLAUERT, A.M., THORNLEY, M.J. (1969) The topography of the bacterial cell wall. Ann. Rev. Microbiol. 23, 159-198

GONENNE, A., ERNST, R. (1978) Solubilisation of membrane proteins by sulfobetaines, Novel zwitterionic surfactants. Anal. Biochem. 87, 28-38

GUEVARA, J., JOHNSTON, D.A., RAMAGALI, L.S., MARTIN, B.A., CAPETILLO, S., RODRIGUEZ, I.V. (1982) Quantitative aspect of silver deposition in proteins resolved in complex polyacrylamide gels. Electrophoresis 3,197-205

HANCOCK, R.E.W., CAREY, A.M. (1979) Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa:* heat - and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. J. Bacteriol. 140, 902-910

HARRICK, N.J. (1967) Internal Reflection Spectroscopy. Interscience. Wiley, New York, 1967

HASEGAWA, Y., YAMADA, H., MIZUSHIMA, S. (1976) Interactions of outer membranes proteins 0-8 and 0-9 with peptidoglycan sacculus of *Escherichia coli* K-12. J. Biochem. 80, 1401-1409

HASIN, H., ROTTEM, S., RAZIN, S. (1975) The outer membrane of *Proteus mirabilis*. I. Isolation and characterisation of the outer and cytoplasmic membrane fractions. BBA 375, 381-394

HELENIUS, A., SIMONS, K. (1975) Solubilization of membranes by detergents. BBA 415, 29-79

HELENIUS, A. Mc CASLIN, D.R., FRIES, E., TANFORD, C. (1979) Properties of detergents. In: Methods in Enzymol. 56, 734-749. S. Fleischer and L. Packer (Eds.). Biomembranes, Part G. Bioenergetics, Biogenesis of Mitochondria, Organisation and Transport. Academic Press, Inc, New York and London, 1979

HENDERSON, R. (1979) Membrane Transduction Mechanisms. R.A. Cone and J.E. Dowling (Eds.). Raven Press, New York, 1979

HILDRETH, J.E.K. (1982) N-D-Gluco-N-methylalcanamide componds, a new class of non-ionic detergents for membrane biochemistry. Biochem. J. 207, 363-366

HJELMELAND, L.M., CHRAMBACH, A. (1981) Electrophoresis and electrophocusing in detergent containing media: a discussion of basic concepts. Electrophoresis 2, 1-11

HJELMELAND, L.M., CHRAMBACH, A. (1984) Solubilisation of functional membrane proteins. In: Methods in Enzymol. 104, 305-318. W.B. Jakoby (Ed.) Enzyme Purification and Related Techniques. Part C. Academic Press, Inc., New York and London, 1984

HORIGOME, T., SUGANO, H. (1983) A rapid method for removal of detergents from protein solution. Anal. Biochem. 130, 393-396

HUNKAPILLER, M.W., LUJAN, E., OSTRANDER, F., HOOD, L.E. (1983) Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. In: Methods in Enzymol. 91, 227-236. C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff (Ed.) Enzyme Sttructure, Part I, Academic Press, Inc., New York and London, 1983

IMOTO, T., Johnson, L.N., NORTH, A.C.T., PHILLIPS, D.C., RUPLEY, J.A. (1972) Vertebrate lysozymes. In: The Enzymes. Vol VII, 666-864. P.D. Boyer (Ed.). Academic Press. New York and London, 1972

INGLEDEW, W.J., POOLE, R.K. (1984) The respiratory chains of *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 48, 222-271

INOUYE, M. (1974) A tree-dimensional molecular assembly model of a lipoprotein from the *Escherichia coli* outer membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71,2396-2400

INOUYE, M. (1979) Bacterial Ounter Membranes. A Wiley - Interscience Publication. John Wiley et Sons. New York, Chichester, Brishane, Toronto, 1979

JAY, J., LAMBILLOTTE, M., WISS, F., BRUNISHOLS, R., MUEHLETHALER, K. (1984) Topology of the Thylakoid Polypeptides of *Rhodopseudomonas viridis*. Sixt Int. Congress on Photosynthesis, Vol III. 361-364. 1983 C. Sybesma (Ed.) M. Nyhoff and Dr. W. Young (Pubisher)

JENSEN, S.E., FECYCZ, I.T., STEMKE, G.W., CAMBELL,J.N. (1979) Demonstration of a cell-associated, inactive precursor of an exocellular protease produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Can. J. Microbiol. 26, 87-93

JI, T.H. (1979) The application of chemical cross-linking for the study of cell membranes and the identification of cell surface receptors. BBA 559, 39-69

JI, T.H. (1983) Bifunctional reagents. In: Methods in Enzymol. 91, 580-609 C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff (Eds.). Enzyme Structure. Part I. Academic Press, Inc. New York and London, 1983

KARRENBERG, F. (1981) Biochemische Charakterisierung der "Pink Envelope" von *Micrococcus radiodurans*.Diplomarbeit. Universität Düsseldorf, 1981

KARRENBERG, F., RACHEL, R., BAUMEISTER, W. (1982) Characterization of the major envelope protein from *Micrococcus radiodurans*. Abstracts of the Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Zellbiologie (Munich, 18-20 March, 1982). Eur. J. Cell Biol. 27,15

KESSEL, M. (1978) A unique cristalline wall layer in the cyanobacterium *Microcystis marginata*. J. Ultrastruct. Res. 62, 203-212

KEYNYON, C.J. (1983) The bacterial response to DNA damage. TIBS 8, 84-87

KIEHM, D.J., JI, T.H. (1977) Photochemical cross-linking of cell membranes. J. Biol. Chem. 252, 8524-8531

KITAYAMA, S., MATASUYAMA, A. (1971) Double-strand scissions in DNA of gamma-irradiated *Micrococcus radiodurans* and their repair during postirradiation incubation. Agr. Biol. Chem. 35, 642-650

KLEFFEL, B. (1981) Infrarotspektroskopische Untersuchungen zur Sekundärstruktur mitochondrialer Cytochrom-C-Oxidase. Diplomarbeit. Universität Düsseldorf, 1981

KLEFFEL, B., GARAVITO, R.M., BAUMEISTER, W., ROSENBUSCH, J.P. (1985) Secondary structure of a channel-forming protein: porin from *Escherichia coli* outer membranes. EMBO J. 4, 1589-1592

KNIVETT, V.A., CULLEN, J., JACKSON, M. (1965) Odd numbered fatty acids in *Micrococcus radiodurans*. Biochem. J. 96, 26-36

KOGA, T., KAWATA, T. (1983) Isolation and characterization of the outer membrane from *Vibrio parahaemolyticus*. J. Gen Microbiol. 129, 3185-2196

KOVAL, S.F., MURRAY, R.G.E. (1984) The isolation of surface array proteins from bacteria. Can. J. Biochem. Cell. Biol. 62, 1181-1189

KRIEGER-BRAUER, H.J., BRAUN, V. (1980) Functions related to the receptor protein specified by the tsx gene of *Escherichia coli*. Arch. Microbiol. 124, 233-242

KÜBLER, O., BAUMEISTER, W. (1978) The structure of a periodic cell wall component (HPI-layer) of *Micrococcus radiodurans*. Cytobiol. 17, 1-9

KÜBLER, O., ENGEL, A., ZINGSHEIM, H.P., EMDE, B., HAHN, M., HEIßE, W., BAUMEISTER, W. (1980) Structure of the HPI-layer of *Micrococcus radiodurans*. In: Electron Microscopy at Molecular Dimension. W. Baumeister and W. Vogell (Eds). Springer-Verlag. Berlin - Heidelberg - New York, 1980

KUSHNER, D.J. (1978) Microbial Life in Extreme Environments. D.J. Kushner (Ed.). Academic Press. London - New York - San Francisco, 1978

LABISCHINSKY, H., BARNICKE, G., BRADACZEK, H., NAUMANN, D., RIETSCHEL, E.T., GIESBRECHT, P. (1985) High state of order of isolated bacterial lipopolysaccharide and its possible contribution to the permeation barrier property of the outer membrane. J. Bacteriol. 162, 9-20

LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227, 680-685

LAMBIN, P. (1978) Reliability of molecular weight determination of proteins by polyacrylamide gradient electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. Anal. Biochem. 85, 114-125

LANCY, P., Jr., MURRAY, R.G.E. (1978) The envelope of *Micrococcus radiodurans:* isolation, purification, and preliminary analysis of the wall layers. Can J. Microbiol. 24, 162-176

LANE, L.C. (1978) A simple method for stabilizing protein-sulfhydryl groups during SDS-gel-electrophoresis. Anal. Biochem. 86, 655-664

LANE, L.C., HURLBERT, R.E. (1980) Isolation and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chromatium vinosum*. J. Bacteriol. 143, 349-354

LEE, Y.C., MONTGOMERY, R. (1980) Determination of hexoamines. Arch. Biochem. Biophys. 93, 292-296

LEIVE, L. (1965) Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 290-296

LEIVE, L. (1974) The barrier function of the gram-negative envelope. Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 109-124

LISCHWE, M.A., OCHS, D. (1982) A new method for partial peptide mapping using N-chlorosuccinimide/urea and peptide silver staining in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Annal. Biochem. 127, 453-457

LIU, T.Y. (1977) The role of sulfur in proteins. In: The Proteins. Vol. III, 239-403. H. Neurath and R.L. Hill (Eds.). Academic Press. New York - San Francisco - London, 1977

LOMENT, A.M., FAIRBANKS, G. (1976) Chemical probes of extented biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking regent. (35S)-Dithiobis(succinimidyl propionate). J. Mol. Biol. 104, 243-261

LONSDALE-ECCLES, J.D., LYNLEY, A.M., DALE, B.A. (1981) Cyanogen bromide cleavage of proteins in sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gels. Biochem. J. 197, 591-597

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275

LUFT, J.H. (1971) Rutheniumred and violet: I. Chemistry-purification, mehtods for use for electron microscopy and mechanisms of action. Anat. Rec. 171, 347-368

LUGTENBERG, B., VAN ALPHEN, L. (1983) Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. BBA 737, 51-115

LUTTER, L.C., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1974) Ribosomal protein neighborhoods. Mol Gen. Genet. 129, 167-176

LUTTER, L.C., KURLAND, C.G., STÖFFLER, G. (1975) Protein neighborhoods in the 30S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. FEBS Letters 54, 144-150

MacGREGOR, C.H., BISHOP, C.W., BLECH, J.E. (1979) Localisation of proteolytic activity in the outer membrane of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 137, 574-583

MANNING, P.A., REEVES, P. (1978) Outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12: isolation of a common receptor protein for bacteriophage T6 and colicin K. Mol. Gen. Genet. 158, 279-286

MARGOLIS, J., KENRICK, K.G. (1968) Polyacrylamide gel electrophoresis in a continuous molecular sieve gradient. Anal.Biochem. 25, 347-362

MATHER, I.H., TAMPLIN, C.B. (1979) A method for the determination of protein in the presence of Triton X-100. Anal. Biochem. 93, 139-142

MAURER, H.R. (1971) Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Walter de Gruyter, Berlin - New York, 1971

MICHEL, H. (1984) EMBO. Practical course on purificiation and crystallisation of membrane proteins. Max Planck-Institut für Biochemie. Martinsried (München), 1984

MITCHEL, R.E.J. (1973) *Micrococcus radiodurans* 5'-nucleotidase. BBA 309, 116-126

MITCHEL, R.E.J. (1975) Involvement of hydroxyl radicals in the release by ionizing radiation of a cell surface nuclease from *Micrococcus radiodurans*. Radiat. Res. 64, 321-330

MITCHEL, R.E.J. (1975) Origin of cell surface proteins released from *Micrococcus radiodurans* by ionizing radiation. Radiat. Res. 64, 380-387

MITCHEL, R.E.J. (1976) Ionizing radiation damage in *Micrococcus radiodurans* cell wall: release of polysaccharide. Radat. Res. 66, 158-169

MITCHEL, R.E.J. (1978) The radiation-releasable cell wall nuclease of *Micrococcus radiodurans*. BBA 524, 362-372

MITCHEL, R.E.J. (1980) *Micrococcus radiodurans* surface exonuclease dimer to monomer conversion by ionizing radiation-generated aqueous free radicals. BBA 621, 138-146

MITCHEL, R.E.J. (1981) Loss of covalently linked lipid as the mechanism for radiation-induced release of membrane-bound polysaccharide and exonuclease from *Micrococcus radiodurans*. Radiat. Res. 87, 341-349

MIZUHIRA, V., FUTAESAKU, Y. (1972) New fixation for biological membranes using tannic acids. Acta histochem. Cytochem. 5, 233-236

MIZUNO, T. (1979) A novel peptidoglycan-associated lipoprotein found in the cell envelope of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. J. Biochem. 86, 991-1000

MIZUNO, T., KAGEYAMA, M. (1979) Isolation and characterization of major outer-membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO with special reference to peptidoglycan-associated protein. J. Biochem. 86, 979-989

MIZUNO, T., CHOU, M.Y., INOUYE, N. (1983) A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. J. Biol. Chem. 258, 6932-6940

MOOR, H., MÜHLETHALER, K., WALDER, H., FREY-WYßLING, A. (1961) A new freezing ultramicrotome. J. Biophys. Biochem. Cytol. 10, 1-13

MOVVA, N.R., NAKAMURA, K., INOUYE, M. (1980) Gene structure of the OmpA protein, a major surface protein of *Escherichia coli* requiret for cell-cell interaction. J. Mol. Biol. 143, 317-328

MÜHLRADT, P.F. (1976) Topography of outer membrane assembly in *Salmonella*. J. Supramol. Struct. 5, 103-108

MURRAY, R.G.E., ROBINOV, C.F. (1958) Cytological Studies of a Tetrad-forming Coccus. G. Tuneval (Ed.). Tuneval, Alquist and Wissels, Stockholm, 1958

NAKAMURA, K., OSTROVSKY, D.N., MIYAZAWA, T., MIZUSHIMA, S. (1974) Infrared spectra of outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli*. BBA 332, 329-335

NAKAMURA, K., MIZUSHIMA, S. (1976) Effects of heating in dodecyl sulfate solution on the conformation and electrophoretic mobility of isolated major outer membrane proteins from *Escherichia coli* K-12. J. Biochem. 80, 1411-1422

NEVILLE, D.M. (1974) Molecular weight determination of membrane protein and glycoprotein subunit by discontinuous gel electrophoresis in dodecyl sulphate. In: Methods in Enzymol. 32, 92-102. S. Fleischer and L. Parker (Eds.) Biomembranes. Part B. Academic Press Inc., New York and London, 1974

NIELSON, A.J., GRIFFITH, W.P. (1978) Tissue fixation and staining with osmium tetroxide: the role of phenolic compounds. J. Histochem. Cytochem. 26, 138-140

NIKAIDO, H., NAKAE, T. (1979) The outer membrane of gram-negative bacteria. In: Advences in Microbiol. Physiology 20, 163-250. A.H. Rose and J.G. Morris (Eds.). Academic Press, New York and London, 1979

NIKAIDO, H., VAARA, M. (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev. 49, 1-32

NISONSON,I. TANNENBAUM, M., NEU, H.C. (1969) Surface localization of *Escherichia coli* 5'-nucleotidase by electron microscopy. J. Bacteriol. 100, 1083-1090

NORTH, M.J. (1982) Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. Microbiol. Rev. 46, 308-340

OCHS, D.C., McCONKEY, E.H., SAMMONS, D.W. (1981) Silver stains for proteins in polyacrylamide gels: A comparison of six methods. Electrophoresis 2,304-307

OKAMURA,M.Y., STEINER, L.A., FEHER, G. (1974) Characterization of reaction centers from photosynthetis bacteria. I. Subunit structure of the protein mediating the primary photochemistry in *Rhodopseudomonas spheroides* R-26. Biochem. 13, 1394-1402

OSBORN, M.J. (1963) Studies on the gram-negative cell wall. I. Evidence for the role of 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. Biochemistry 50, 499-506

OSBORN, M.J. GANDER, J.E., PARISI, E. CARSON, J. (1972) Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol. Chem. 247, 3962-3972

OSBORN, M.J., WU, H,C.P. (1980) Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 34, 369-422

OVCHINNIKOV, Y.A., ABDULAEV, N.G., FEIGINA, M.Y., KISELEV, A.V., LOBANOV, N.A. (1979) The structural basis of the functioning of *Bacteriorhodopsin:* an overview. FEBS Lett. 100, 219-224

OVERBEEKE, N., BERGMANN, H., VAN MANSFELD, F., LUGTENBERG, B. (1983) Complete nucleotide sequence of phoE, the structural gene for the phosphate limitation inducible outer membrane pore protein of *Escherichia coli* K-12. J. Mol. Biol. 163, 513-532 (1983)

PALVA, E.T. (1979) Protein interactions in the outer membrane of *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 93, 495-503

PARKER, S. (1971) Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology and Medicine. F.S. Parker (Ed.) Adam Hilger. London, 1971

PEPINSKY, R.B. (1983) Localization of lipid-protein and protein-protein interactions within the murine retrovirus gag precursor by a novel peptide-mapping technique. J. Biol. Chem. 258, 11229-11235

PERETZ, M, TOWBIN, M., ELSON, D. (1976) The use of a cleavable crosslinking reagent to identify neighboring proteins in the 30-S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 63, 83-92

PETERS, K., RICHARDS, F.M. (1977) Chemical cross-linking: Reagents and problems in studies of membrane structure. Ann. Rev. Biochem. 46, 523-551

PETERS, J., DREWS, G. (1983) Chemical cross-linking studies of the light-harvesting pigment-protein complex B800-850 of *Rhodopseudomonas capsulata*. Eur. J. Cell Biol. 29, 115-120

PETERS, J. (1984) Topographische Untersuchungen an den membrangebundenen Pigment-Proteinkomplexen des Photosyntheseapparates von *Rhodopseudomonas capsulata*. Dissertation. Albert-Ludwig - Universität zu Freiburg i.Br.1984

PODUSLO, J.F., RODBARD, D. (1980) Molecular weight estimation using sodium dodecyl sulfate-pore gradient electrophoresis. Anal. Biochem. 101, 394-406

PODUSLO, J.F. (1981) Glycoprotein molecular-weight estimation using sodium dodecyl sulfate-pore gradient electrophoresis: comparison of Tris-glycine and Tris-borate-EDTA buffer systems. Anal. Biochem. 114, 131-139

POEHLING, H.M., NEUHOFF, V. (1981) Visualization of proteins with a silver"stain": A critical analysis. Electrophoresis 2 141-147

PRINGLE, J.R. (1975) Mehtods for avoiding proteolytic artefacts in studies of enzymes and other proteins from yeasts. Meth. Cell Biol. 12, 149-184

QUICHO, M., RICHARDS, F. (1964) Intermolecular cross-linking of a protein in the crystalline state: Carboxypeptidase A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52, 833-839

RACHEL, R. (1982) Proteinchemische Charakterisierung des HPI-Layers von *Micrococcus radiodurans*. Vergleichende Untersuchungen an den Stämmen R_1 und Sark. Diplomarbeit. Universität Düsseldorf

RACHEL, R., ENGEL, A., BAUMEISTER, W. (1983) Proteolysis of the major envelope protein of *Deinococcus radiodurans* remains morphologically latent. FEMS Microbiol. Lett. 17, 115-119

REITHMEIER, R.A.F., BRAGG, P.D. (1977) Cross-linking of the proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. BBA 446, 245-256

REYNOLDS, J.A., TANFORD, C. (1970) The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. J. Biol. Chem. 245, 5161-5165

RODBARD, D., KAPADIA, C., CHRAMBACH, A. (1971) Pore gradient electrophoresis. Analytical Biochem. 40, 135-157

ROGERS, H.J., PERKINS, H.R., WARD, J.B. (Eds.) (1980) Membrane functions. In: Microbial Cell Walls and Membranes. 105-165. Chapman and Hall, London - New York, 1980

ROSENBUSCH, J.P. (1974) Characterization of the major envelope protein from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 249, 8019-8029

ROSENBUSCH, J.P., STEVEN, A.C., ALKAN, M., RENEGASS, M. (1980). Matrix porin: a periodically arranged pore protein in the outer membrane of *Escherichia coli*. In: Electron Microscopy at Molecular Dimension, 1-10. W. Baumeister and W. Vogell (Eds.), Springer-Verlag Berlin, 1980

SALCEDO, J.R., HERNANDEZ, R.S., CELIS, H. (1983) Extraction of detergents from hydrophobic proteins with isopentanol: application to electrophoretic analysis of photosynthetic bacterial hydrophobic proteins. Anal. Biochem. 132, 324-327

SAXTON, W.O., BAUMEISTER, W. (1982) The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein. J. Microscopy 127, 127-138

SCHLEGEL, H.G. (1981) Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York,1981

SCHLEIFER, K.H., KANDLER, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implecations. Bact. Rev. 31, 407-477

SCHMID, E.N., SYLEYTR, U.B., LICKFELD, K.G. (1980) Nomenclature of frozen-etched bacterial envelopes. J. Ultrastruct. Res. 71, 22-24

SCHNAITMAN, C.A. (1971) Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by triton X-100. J. Bacteriol. 108, 545-552

SCHNAITMAN, C.A. (1971) Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, triton X-100, and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 108, 553-563

SELTMANN, G. (1982) Die bakterielle Zellwand. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1982

SEREDYNSKI, J. (1979) Quantitative Untersuchung der Veränderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur von Homopolypeptiden und globulären Proteinen bei Elektronenbeschuß (100 keV Elektronen) mit Hilfe rechnerunterstützter ATR-Infrarotspektroskopie. Dissertation, Universität Düsseldorf, 1979

SHALTIEL, S. (1984) Hydrophobic chromatography. In: Methods in Enzymol. 104, 69-98, W.B. Jakoby (Ed.) Enzyme Purification and Related Techniques. Part C. Academic Press Inc., New York and London, 1984

SHAPIRO, A.L., VINUELA, E., MAIZEL, J.V. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem.Biophys.Res.Commun. 28, 815-820

SINGER, S.J. (1974) The molecular organization of membranes. Ann. Rev. Biochem. 43, 805-820

SLEYTR, U.B., GLAUERT, A.M. (1976) Ultrastructure of cell walls of two closely related *Clostridia* that possess different regular arrays of surface subunits. J.Bacteriol.126,869-882

SLEYTR, U.B. (1978) Regular arrays of macromolecules on bacterial cell walls: structure, chemistry, assembly and function. Int. Rev. Cytol. 53, 1-64

SLEYTR, U.B., SHOCKMAN, G.D., HIGGINS, M.L. (1979) Demonstration of an internal fracture plane in cell walls of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. 139, 299-301

SLEYTR, U.B. (1981) Morphological and functional aspects of regular protein membranes present on prokaryontic cell walls. In: Cytomorphogenesis in plants. Cell Biology Monographs 8, 3-26. O.Kiermayer (Ed.) Springer Verlag Wien - New York, 1981

SLEYTR, U.B., GLAUERT, A.M. (1982) Bacterial cell walls and membrane. In: Electron Microscopy of Proteins. Vol. 3, J.E. Harris (Ed.), Academic Press, Inc., New York and London, 1982

SLEYTR, U.B., MESSNER, P. (1983) Crystalline surface layers on bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 37, 311-339

SMIT, J., KAMIO, Y., NIKAIDO, M. (1975) Outer membrane of *Salmonella typhimurium:* chemical analysis and freeze-fracture studies with lipopolysaccharide mutants. J. Bacteriol. 124, 942-958

SMITH, R.J., CAPALDI, R.A. (1977) Nearest neighbor relationships of the polypeptides in ubiquinone cytochrome c reductase (complex III). Biochem. 16, 2629-2637

SOMMER, A., TRAUT, R. (1974) Diagonal polyacrylamide dodecyl sulfate gel electrophoresis for the identification of ribosomal proteins cross-linked with methyl-4-mercapto-butyrimidate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3946-3950

STACKEBRANDT, E., WOESE, C.R. (1979) A phylogenetic dissection of the family Micrococcaceae. Cur. Microbiol. 2, 317-322

STANLEY, K.K., PITT, T.J. (1983) Quantification of polyacrylamide gel bands by digital image processing. Anal. Biochem. 133, 476-481

STECK, T.L. (1972) Cross-linking the major proteins of the isolated erythrocyte membrane. J. Mol. Biol. 66, 295-305

STEFFENS, G.J. (1980) Untersuchungen an Cytochrom-c-Oxidase. Primärstruktur und Funktion der Untereinheit II." Habilitationsschrift. Technische Hochschule Aachen, 1980

STRYER, L. (1981) Biochemistry, Chapters IV, VII. Freeman and Co., San Francisco, 1981

STUDER, D., MOOR, H., GROSS, H. (1981) Single bacteriorhodopsin molecules revealed on both surfaces of freeze-dried and heavy metal - decorated purple membranes. J. Cell.Biol. 90, 153-159

STUDIER, F.W. (1973) Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. J. Mol. Biol. 79, 237-248

TADROS, M.H., SUTER, F., DREWS, G., ZUBER, H. (1983) The complete amino acid sequence of the large bacteriochlorophyll-binding polypeptide from light-harvesting complex II (B800-850) of *Rhodopseudomonas capsulata.* Eur. J. Biochem. 129, 533-536

TADROS, M.H., SUTER, F., SEYDEWITZ, H, WITT, J., ZUBER, H, DREWS, G. (1984) Isolation and complete amino acid sequence of the small polypeptide from light-harvesting pigment-protein complex I (B870) of *Rhodopseudomonas capsulata*. Eur. J. Biochem. 138, 209-212

TANFORD, C. (1962) Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins. J. Am. Chem. Soc. 84, 4240-4247

TANFORD, C., REYNOLDS, J.A. (1976) Characterisation of membrane proteins in detergent solutions. BBA 457, 133-170

THOMPSON, B.G. (1981) An ultrastructural and biochemical study of the cell envelope of *Deinococcus radiodurans* strain Sark. Dissertation, The University of Western Ontario. London, Ontario (Canada) 1981

THOMPSON, B.G., ANDERSON, R., MURRAY, R.G.E. (1980) Unusual polar lipids of *Micrococcus radiodurans* strain Sark. Can. J. Microbiol. 26, 1408-1411

THOMPSON; B.G., MURRAY, R.G.E. (1982) The fenestrated peptidoglycan layer of *Deinococcus radiodurans*. Can. J. Microbiol. 28, 522-525

THOMPSON, B.G., MURRAY, R.G.E, BOYCE, J.F. (1982) The association of the surface array and the outer membrane of *Deinococcus radiodurans*. Can. J. Microbiol. 28, 1081-1088

THORNLEY, M.J. HORNE, K.J.I., GLAUERT, A.M. (1965) The fine structure of *Micrococcus radiodurans*. Arch. Microbiol. 51, 267-289

TOKUNAGA, H., TOKUNAGA, M., NAKAE, T. (1979) Characterization of porins from the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. I. Chemical analysis. Eur. J. Biochem. 95, 433-439

VAN RENSWOUDE, J., KEMPF, C. (1984) Purification of integral membrane proteins. In: Methods in Enzymol. 104, 329-339 W.B. Jakoby (Ed.) Enzyme Purification and Related Techniques, Part C. Academic Press, Inc. New York and London 1984

VENABLE, J.H., COGGESHALL, R. (1965) A simplified lead citrat stain for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 25, 407-408

VERKLEIJ, A.J., VERVERGAERT, P.H.J.T. (1978) Freeze-fracture morphology of biological membranes. BBA 515, 303-327

WACHSTEIN, M., MEISEL, E. (1957) Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. Am. J. Clin. Path. 27, 13-23

WANG, K., RICHARDS, F.M. (1974) An approach to nearest neighbor analysis of membrane proteins. J. Biol. Chem. 249, 8005-8018

WAWRA, H., BASCHMANN, H., FORMANEK, H., FORMANEK, S.(1979) Strukturuntersuchung mit Röntgenbeugungsmethoden an Lipopolysacchariden von *Salmonella minnesota*. Mutante S SF 111 und R 595 SF 1167. Z. Naturforsch. 34c, 172-178

WEBER, K., OSBORN, M. (1969) The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412

WECKESSER, J., ZALMAN, L.S., NIKAIDO, M. (1984) Porin from *Rhodopseudomonas sphaeroides*. J. Bacteriol. 159, 199-205

WEISS, R.L. (1974) Subunit cell wall of *Sulfolobus acidocaldarius*. J. Bacteriol. 118, 275-284

WEISSBACH, A., HURWITZ, J. (1959) The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B (I. Identification). J. Biol. Chem. 234, 705-712

WENNERSTRÖM, H., LINDMAN, B. (1979) Micelles, physical chemistry of surfactant association. Physics Report 52,1-86

WESSEL, D. FLÜGGE, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. Anal. Biochem. 138, 141-143

WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O., BISTER,F.(1952) Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z. Naturforsch. 7b, 148-155

WHITAKER, J.F. (1969) A general colorimetric procedure for the estimation of enzymes which are linked to the NADH/NAD^+-system. Clin. Chim. Acta 24, 23-37

WICKEN, A.J., KNOX, K.W. (1980) Bacterial cell surface amphiphiles. BBA 604, 1-26

WILDHABER, I., GROSS, H, MOOR, H. (1982) The control of freeze-drying with deuterium oxide (D_2O). J. Ultrastruct. Res. 80, 367-373

WILDHABER, I. (1983) Hochauflösende Abbildung einer parakristallinen Protein-Membranstruktur mittel Gefriertrocknung und Schwermetallbeschattung. Dissertation Eidgenössische Technische Hochschule. Zürich 1983

WILDHABER, I., GROSS, H., ENGEL, A., BAUMEISTER, W. (1985) The effects of air-drying and freeze-drying on the structure of a regular protein layer. Ultramicroscopy 16, 411-422

WILKINSON, B.J., ELLER, D.J. (1975) Morphogenesis of the membrane-bound electron-transport system in sporulating *Bacillus megaterium* KM. Eur. J. Biochem. 55,131-139

WITTMANN, H.G. (1976) The seventh Sir Hans Krebs lecture. Structure, function and evolution of ribosomes. Eur. J. Biochem. 61, 1-13

WORK, E., GRIFFITHS, H. (1968) Morphology and chemistry of cell walls of *Micrococcus radiodurans*. Nature (London) 201, 1107-1109

WRAY, W., BOULIKAS, T., WRAY, V.P., HANCOCK, R. (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 118, 197-203

YOUNG, D.A., VORIS, B.P., MAYTIN, E.V., COLBERT, R.A. (1983) Very hig-resolution two-dimensional electrophoretic separation of protein on giant gels. In: Methods in Enzymol. 91, 190-214 C.H.W. Hirs and S.N. Timashoff (Eds). Enzyme Struckture, Part I., Academic Press, Inc. New York and London, 1983

YUTHAVONG, Y., FELDMAN, N., BOYER, P.D. (1975) Some chemical characteristics of dimethylsuberimidate and its effect on sarcoplasmic reticulum vesicles. BBA 382, 116-124

ZALMAN, J.S., NIKAIDO, H. (1985) Dimeric porin from *Paracoccus denitrificans*. J. Bacteriol. 162, 430-433

ZINGSHEIM, H.P., ABERMANN, R., BACHMANN, J. (1970) Apparatus for ultrashadowing of freeze etched electron microscopic specimens. J. Phys. E 3, 39-42

ZWIZINSKI, C., DATE, T., WICKNER, W. (1981) Leader peptidase is found in both the inner and outer membranes of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 256, 3593-3597

7. Anhang

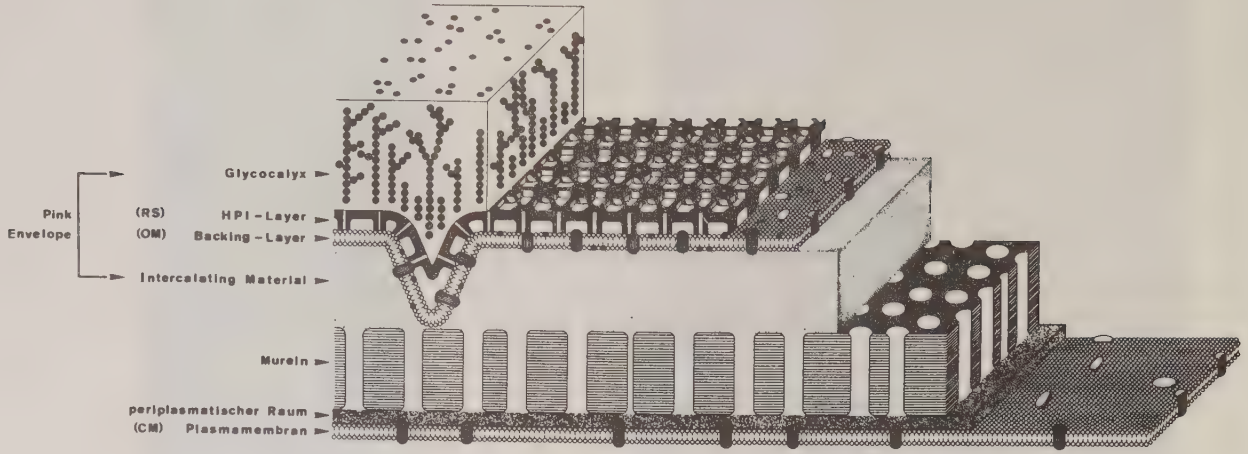
Tafel/Bildbeschreibung

Tafel 1 Morphologisches Zellwandmodell von *Deinococcus radiodurans*

(aus Emde et al., 1980)

Dieses Modell entstand aus einer Zusammenfassung von unterschiedlichen elektronenmikroskopischen Untersuchungen (siehe 1.2).

Zellwandmodell von Deinococcus radiodurans

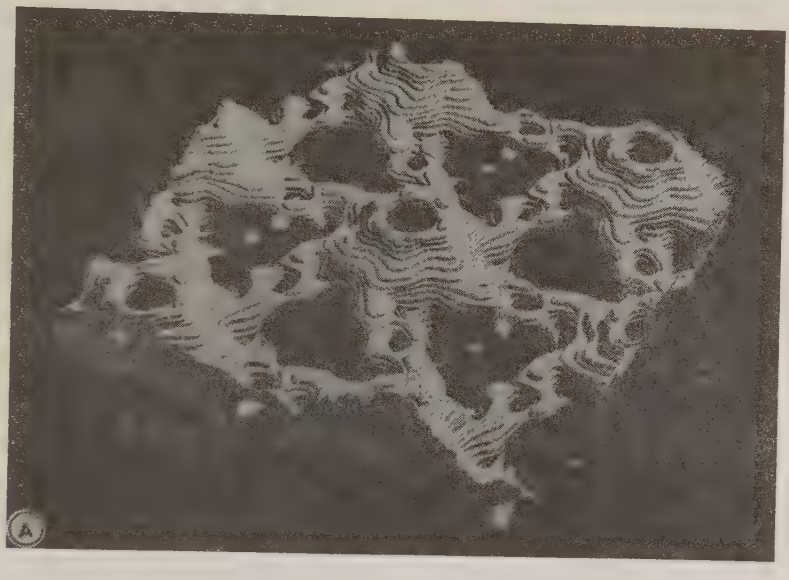


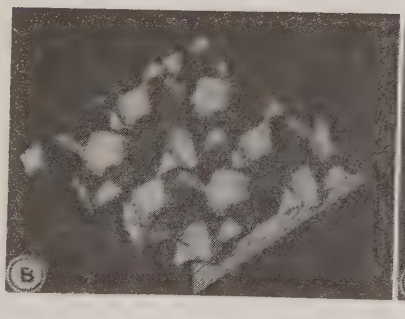
Tafel 2 Die Feinstruktur des HPI-Layers

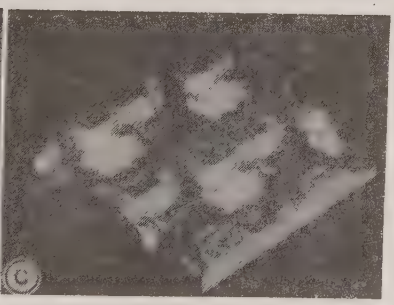
Abb. A: Balsaholzmodell des HPI-Layers von *Deinococcus radiodurans*
Das Modell zeigt die innere Seite des Layers (d.h. die Seite, die im intakten Bakterium zu der Außenseite der Membran gerichtet ist). Die erreichte Auflösung beträgt 1.5 nm (aus negativkontrastierten Präparaten, die mit einer Kippserie im Elektronenmikroskop mikroskopiert wurden). Man erkennt in der Mitte des Modells den Hauptanteil der molekularen Masse ("Core"), konzentriert um eine sechsfache Achsensymmetrie. Der "Core" umschließt die innere Pore. Von jeder Untereinheit ("Core") gehen Stege aus. Sie unterteilen die Peripherie einer Einheitzelle in Rosetten.

Abb. C, D: Dreidimensionale Darstellung des HPI-Layers von *Deinococcus radiodurans*, erhalten durch Oberflächenrekonstruktion (im Computer) aus Bildern von Metall-bedampften Präparaten
Abb. B zeigt die Außenfläche des Layers
Abb. C zeigt die Innenfläche des Layers

Die Auflösung dieses Modells beträgt 2 bis 2.5 nm. Der "Core" ist eindeutig in sechs Untereinheiten (auf der Außenseite) unterteilt. Diese sind mit den benachbaten "Cores" über Stege verbunden.

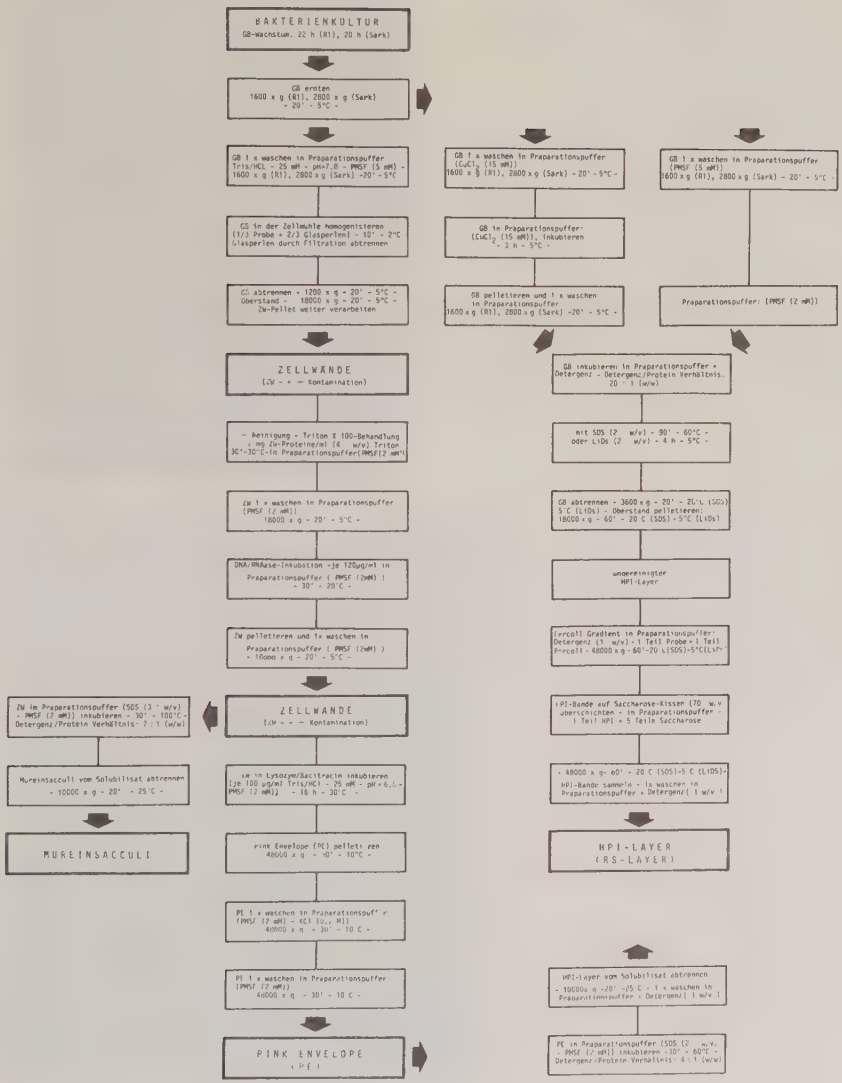

A


B


C

Tafel 3 Präparationsschema

Übersicht über die unterschiedlichen Präparationswege zur Herstellung von a) Mureinsacculi, b) Zellwände
c) Pink Envelope
d) HPI-Layer


BAKTERIENKULTUR
GB-Wachstum, 22 h (R1), 20 h (Sark)
GB ernten
1600 x g (R1), 2800 x g (Sark)
- 20' - 5°C -
GB 1 x waschen in Präparationspuffer
Tris/HCl - 25 mM - pH=7,8 - PMSF (5 mM) -
1600 x g (R1), 2800 x g (Sark) -20' - 5°C
GB 1 x waschen in Präparationspuffer
(CuCl2 (15 mM)]
1600 x g (R1), 2800 x g (Sark) - 20' - 5°C -
GB 1 x waschen in Präparationspuffer
(PMSF (5 mM)
1600 x g (R1), 2800 x g (Sark) - 20' - 5°C -
GB in Präparationspuffer:
(CuCl2 (15 mM)], inkubieren
2 - 3 h - 5°C -
GS in der Zellmühle homogenisieren
(1/3 Probe + 2/3 Glasperlen) - 10' - 2°C
Glasperlen durch Filtration abtrennen
GB abtrennen - 1200 x g - 20' - 5°C -
Überstand - 18000 x g - 20' - 5°C -
ZW-Pellet weiter verarbeiten
GB pelletieren und 1 x waschen
in Präparationspuffer
1600 x g (R1), 2800 x g (Sark) -20' - 5°C -
Präparationspuffer: (PMSF (2 mM))
ZELLWÄNDE
(ZW - + - Kontamination)
- Reinigung - Triton X 100-Behandlung
z mg ZW-Protein/ml (4 w/v) Triton
30'-30°C-in Präparationspuffer(PMSF(2 mM)
GB inkubieren in Präparationspuffer +
Detergenz - Detergenz/Protein Verhältnis:
20 - 1 (w/v)
mit SDS (2 w/v) - 90' - 60°C -
oder LiDS (2 w/v) - 4 h - 5°C -
ZW 1 x waschen in Präparationspuffer
(PMSF (2 mM)]
18000 x g - 20' - 5°C -
GB abtrennen - 3600 x g - 20' - 20°C (SDS)
5°C (LiDS) - Überstand pelletieren:
18000 x g - 60' - 20°C (SDS) - 5°C (LiDS)
DNA/RNAse-Inkubation - je 120µg/ml in
Präparationspuffer (PMSF (2mM))
- 30' - 20°C -
ungereinigter
HPI-Layer
ZW pelletieren und 1x waschen in
Präparationspuffer (PMSF (2mM))
- 15000 x g - 20' - 5°C -
Percoll Gradient in Präparationspuffer/
Detergenz (1 w/v) - 1 Teil Probe + 1 Teil
Percoll - 48000 x g - 60'-20°C (SDS)-5°C(LiDS)
ZW im Präparationspuffer (SDS (3 - w/v)
- PMSF (2 mM)] inkubieren - 30' - 100°C -
Detergenz/Protein Verhältnis: 7 : 1 (w/w)
ZELLWÄNDE
(ZW - + - Kontamination)
HPI-Bande auf Saccharose-Kissen (70 w.v
überschichten - in Präparationspuffer -
1 Teil HPI + 5 Teile Saccharose
Mureinsacculi vom Solubilisat abtrennen
- 10000 x g - 20' - 25°C -
zW in Lysozym/Bacitracin inkubieren
(je 100 µg/ml Tris/HCl - 25 mM - pH=6,8 -
PMSF (2 mM)] - 16 h - 30°C -
- 48000 x g - 60' - 20°C (SDS)-5°C (LiDS)-
HPI-Bande sammeln - in waschen in
Präparationspuffer + Detergenz(1 w/v)
MUREINSACCULI
Pink Envelope (PE) pelletieren
48000 x g - 40' - 10°C -
HPI-LAYER
(RS-LAYER)
PE 1 x waschen in Präparationspuffer
(PMSF (2 mM) - KCl (0,2 M))
48000 x g - 30' - 10°C -
PE 1 x waschen in Präparationspuffer
(PMSF (2 mM))
48000 x g - 30' - 10°C -
HPI-Layer vom Solubilisat abtrennen
- 10000x g -20' -25°C - 1 x waschen in
Präparationspuffer + Detergenz(1 w/v)
PINK ENVELOPE
(PE)
PE in Präparationspuffer (SDS (2 w.v
- PMSF (2 mM)] inkubieren -30' - 60°C -
Detergenz/Protein Verhältnis: 4 : 1 (w/w)

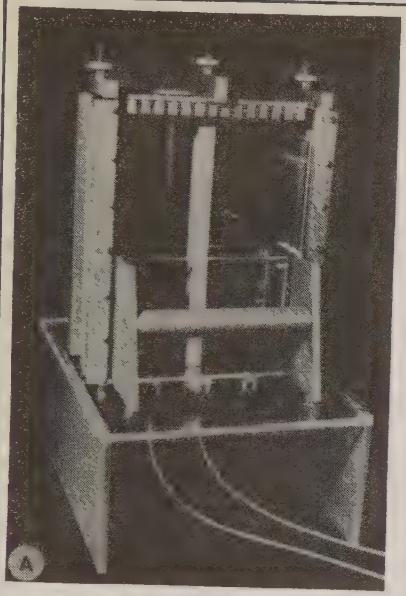
Tafel 4 PAGE-Apparatur

Abb. A: Abbildung der Gießvorrichtung

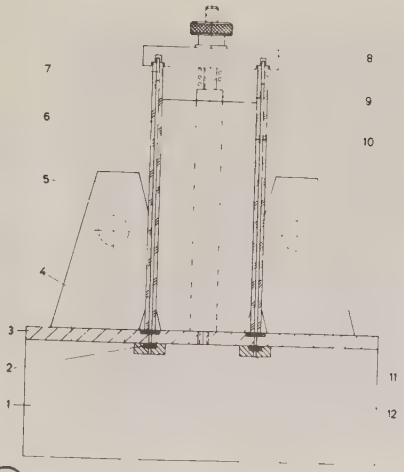
Abb. B: Technische Querschnittzeichnung der Gießvorrichtung
1: Grundsockel, 2 und 4: Silicondichtungen, 3: horizontale Grundplatte, 5 und 10: vertikale Stützen, 6: Glasplatte, 8 und 9: Schraubstöcke, 11 und 12: Einstechvorrichtung

Abb. C: Abbildung des oberen Troges

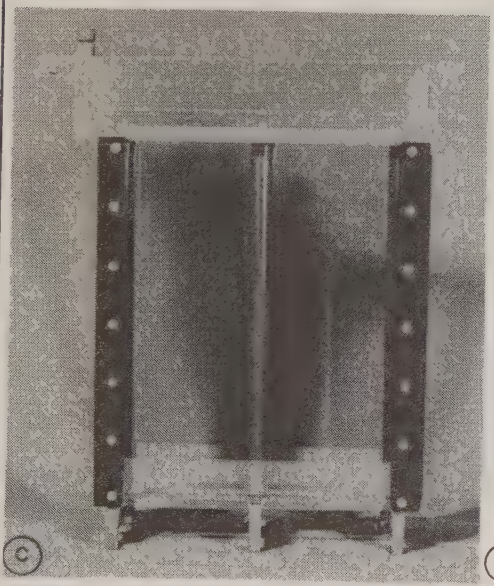
Abb. D: Technische Querschnittzeichnung des oberen Troges
1: Fuß, 2: Glasplatte, 3: Distanzstück, 4: Aufhängung, 5: Silicondichtung, 6: Pufferreservoir, 7: Elektrodenhalterung, 8: Arretierung, 9: U-Schiene



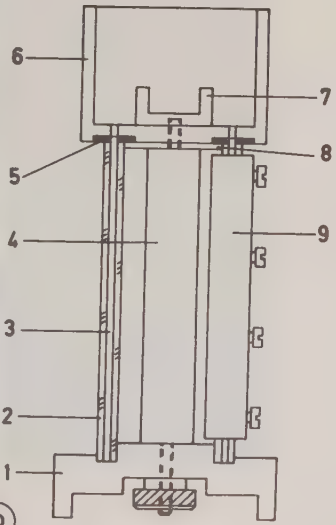
A



B



C



D

Tafel 5 PAGE: Apparatur

Abb. A: Abbildung der montierten Glasplatten und der Distanzstücke mit der integrierten Silicondichtung
Maße in mm

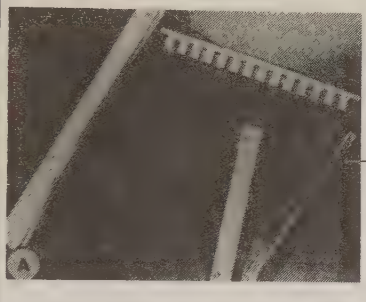
Abb. B: Bahn a: Elektropherogramm vom HPI-Layer (Sark) (isoliert mit 2 % LiDS; 4°C) kontaminiert mit PEp A

Bahn b: Elektropherogramm aus Detergenssolubilisaten von ganzen Bakterienzellen, extrahiert mit SDS (2 % w/v bei 100°C)

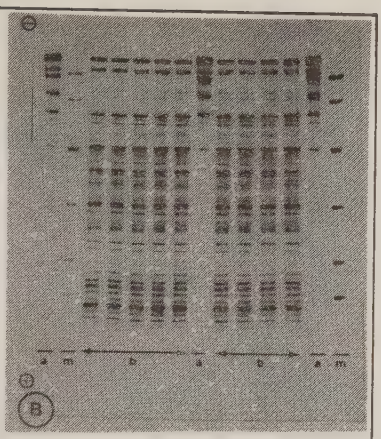
Bahn m: Marker-Proteine von oben nach unten: Phosphorylase B 92 (kD); BSA (66 kD); Ovalbumin (43 kD); Carbonic-Anhydrase (30 kD); Trypsin-Inhibitor (21 kD), Lysozym (14 kD).

SDS-PAge mit Coomassie gefärbt, Gelgradient 10 - 16 % Acrylamid
Trenngellänge 30 cm

Abb. C: Abbildung der kompletten PAGE-Apparatur
(für variable Trennlängen: 16 bis 32cm)


A

1
1,4
2
15


a
m
b
a
b
a
m
B

C

Tafel 6 Charakteristische Infrarotbanden von Proteinen, Lipiden und Zuckern

Charakteristische Infrarotbanden von Proteinen

Bandenlage cm^{-1}	Stärke*	Schwingung und Zuordnung
3280-3300	s	ν(N-H) Amid A
3050-3080	w	1. Oberschwingung des Amid II (Fermi-Resonanz) Amid B
2960	s	ν_a(C-H) (von $-CH_3$)
2920	w	ν_a(C-H) (von $-CH_2$)
2870	m	ν_s(C-H) (von $-CH_3$)
2855	sh	ν_s(C-H) (von $-CH_2$)
1630-1660	s	ν(C-O) δ(N-H) Amid I (+) ν(C-N)
1515-1550	s	δ(N-H) ν(C-N) Amid II (+)
1390-1380	m	δ_s(C-O) symmetrische Deformationsschwingung (C-C=O) saurer Aminosäureseitenketten
1250-1300	m	ν(C-N) δ(N-H) ν(C-O) Amid III δ(O-C-N) ν(C_α-C)

(+) Bandenlage ist konformationsabhängig

Charakteristische Infrarotbanden von Lipiden

Bandenlage cm^{-1}	Stärke*	Schwingung und Zuordnung
3010	m	ν(C-H) Streckschwingung von (-CH=CH-) von ungesättigten Fettsäuren
2960	m	ν_a(C-H) antisymmetrische Valenzschwingung von Methylgruppen von ($-CH_3$)
2920	s	ν_a(C-H) antisymmetrische Valenzschwingung von Methylengruppen ($-CH_2$)
2870	sh	ν_s(C-H) symmetrische Valenzschwingung von Methylgruppen ($-CH_3$)
2855	s	ν_s(C-H) symmetrische Valenzschwingung von Methylengruppen ($-CH_2$)
1738	s	ν(C=O) Estercarbonyl - Streckschwingung
1460	s	δ_s(C-H) symmetrische Deformationsschwingung von Methylengruppen ($-CH_2$)
1454	s	δ_a(C-H) antisymmetrische Deformationsschwingung von Methylengruppen ($-CH_2$)
1440	s	δ_a(C-H) antisymmetrische Deformationsschwingung von Methylgruppen ($-CH_3$)
1240-1230	s	ν_a(P=O) antisymmetrische Valenzschwingung ν_a($PO\bar{O}$) von $PO\bar{O}$ Gruppen (Phospholipiden)
1160-1180	m	ν (-C-O) Streckschwingung von $-CH_2-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-O-CH_2-$ und γ_w(-C-O) und Nickschwingung von Methylengruppen
1120	m	ν(-C-C) Streckschwingung des Gerüsts oder Äther (-C-O-C-)Schwingung
1080-1060	s	ν_a(P-O-C) antisymmetrische Streckschwingung ν_s($PO\bar{O}$) symmetrische Streckschwingung von $PO\bar{O}$ Gruppen (Phospholipide)

Charakteristische Infrarotbanden von Zuckern

Bandenlage cm^{-1}	Stärke*	Schwingung und Zuordnung
3350-3500	s (Br)	ν(OH) Streckschwingung assoziierter OH Gruppen
1040-1070	s (Br)	ν(c=O) Methylenacetalschwingung und δ(OH) OH-Deformationsschwingung

* Erläuterungen:

s = stark, m = mittel, w = schwach, sh = Schulter, Br = Breite

Lit.: Bandenlage entnommen aus: Parker,F.S. (1971). Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology and Medicine A.Hilger, London

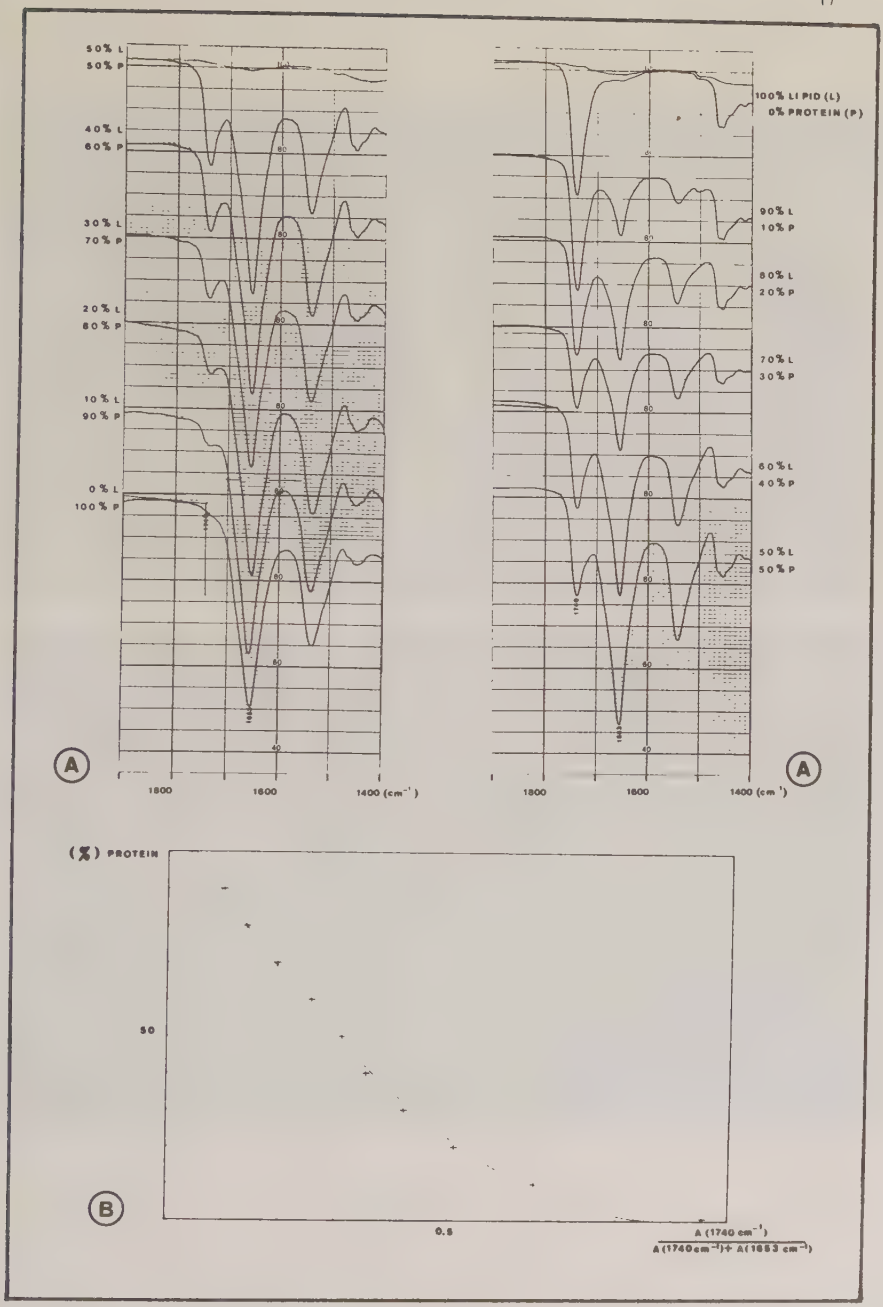
Tafel 7 Lipid/Protein-Eichkurve

Abb. A: Infrarot-Spektren von Cardiolipin-Myoglobin-Gemischen. Die jeweiligen Lipid/Protein-Verhältnisse in den jeweiligen gemessenen Proben sind in Prozent ausgedrückt. Der Meßbereich erstreckt sich von 1800 bis 1400 cm^{-1}.

Abb. B: Die Lipid/Protein-Eichkurve

A = Amplitude der jeweiligen Bande

Das Amplitudenverhältnis zwischen der Amplitude der Estercarbonylstreckschwingungsbande bei λ = 1740 cm^{-1} (A (1740 cm^{-1})) und der Summe dieser Amplitude mit der der Amid I-Bande bei λ = 1653 cm^{-1} (A (1653 cm^{-1})) wurde gegen den Prozentanteil an Proteinen in der Probenmischung aufgetragen.


50% L
50% P
40% L
60% P
30% L
70% P
20% L
80% P
10% L
90% P
0% L
100% P
1740
1653
80
1800
1600
1400 (cm⁻¹)
A
100% LIPID (L)
0% PROTEIN (P)
90% L
10% P
80% L
20% P
70% L
30% P
60% L
40% P
50% L
50% P
1800
1600
1400 (cm⁻¹)
A
(%) PROTEIN
50
0.5
A (1740 cm⁻¹)
A (1740 cm⁻¹) + A (1653 cm⁻¹)
B

Tafel 8 Ultradünnschnitte von ganzen Bakterien

Darstellung der Zellwandmorphologie von *Deinococcus radiodurans* R_1 an ganzen Zellen

Abb. A: *Deinococcus radiodurans* R_1

Abb. B: *Deinococcus radiodurans* Sark

Abb. C: *Deinococcus radiodurans* Sark (CL^-)

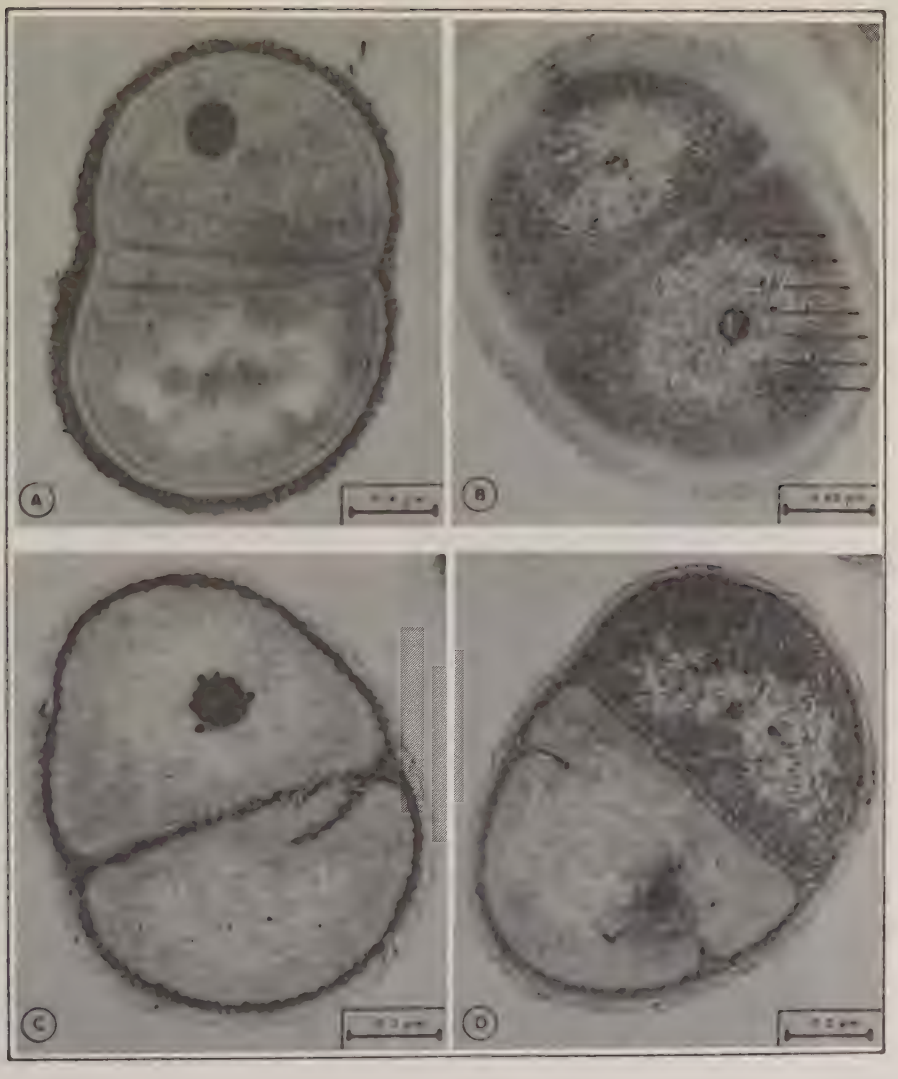
Abb. D: *Deinococcus radiodurans* Sark (HPI^-)

Fixierung: OsO_4/Rutheniumrot

Nachkontrastierung: $Pb(OH)_2$

Abkürzungen:

Cm = cytoplasmatische Membram
PS = periplasmatischer Raum
PG = Murein
IM = Intercalating Material
Om = äußere Membran
S = Surface layer
CL = Kohlenhydratkapsel


A
B
C
D

Tafel 9 Oberflächenstruktur von ganzen Bakterien

Abb. A: Gefrierätzung des Bakteriums *Deinococcus radiodurans* R_1. Der HPI-Layer ist vollständig von der Kohlenhydratkapsel verdeckt. Ein Membranbruch der cytoplasmatischen Membran ist zu sehen (CmEF).

Abb. B: Gefrierätzung des Bakteriums *Deinococcus radiodurans* Sark. Die Oberfläche des HPI-Layers ist gut zu sehen (SES). Ein Membranbruch der cytoplasmatischen Membran ist zu sehen (CmEF).

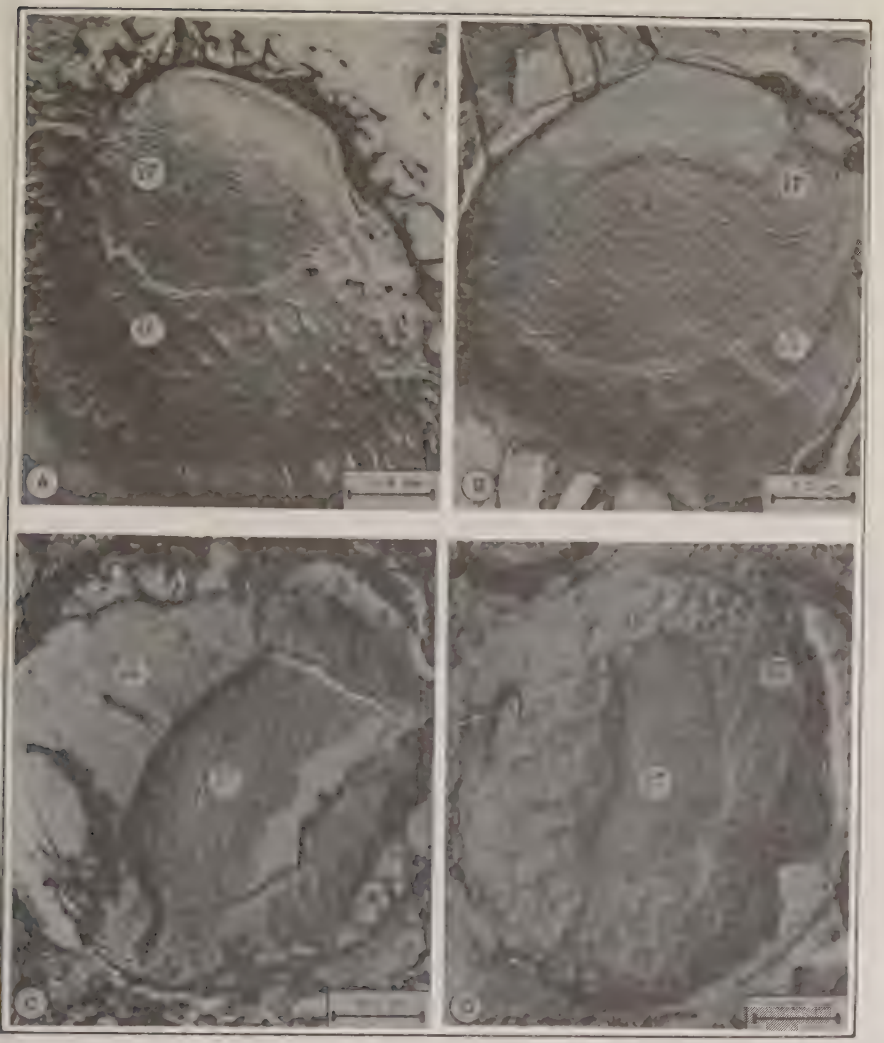
Abb. C: Gefrierätzung des Bakteriums *Deinococcus radiodurans* Sark (CL^-). Die Oberfläche und Feinstruktur des HPI-Layers sind sehr gut sichtbar. Ein Querbruch innerhalb der Zelle liegt vor (CPF).

Abb. D: Gefrierätzung des Bakteriums *Deinococcus radiodurans* Sark (HPI^-). Die amorphe und runzelige Oberfläche der äußeren Membran ist zu sehen. Ein Membranbruch der cytoplasmatischen Membran ist zu sehen (CmEF).

Abkürzungen:
Cm = cytoplasmatische Membran
Om = äußere Membran
Cp = Cytoplasma
S = Surface-Layer

Abkürzungen nach der Nomenklatur von Schmid et al. (1980):

E = surfaces facing the extracellular space
P = surfaces facing the cytoplasma
F = fracture faces
S = etched surfaces


A
B
C
D

Tafel 10 Proteolyse des HPI-Layer-Proteins in Abhängigkeit des Wachstums

Abb. A: Wachstumskurve einer Bakterienkultur aus *Deinococcus radiodurans* R_1

OD = optische Dichte
\+ = Meßpunkte der zellgebundenen Proteinaseaktivität, gemessen mit Azocasein im Verlauf des Wachstums in (Unit · 10^2/mg Zellprotein
· = Meßpunkte der optischen Dichte einer Bakteriensuspension im Verlauf des Wachstums

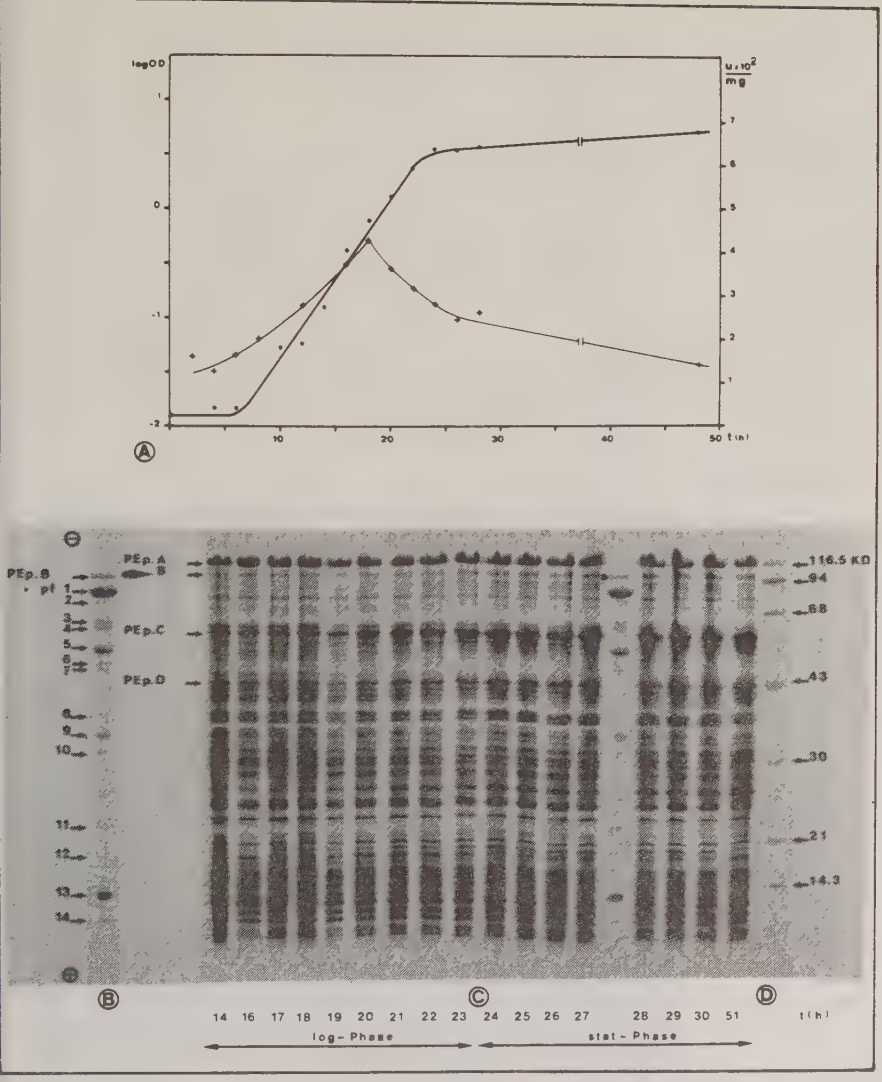
Abb. B: Elektropherogramm einer (60°C - SDS -) HPI-Präparation R_1

Abb. C: Elektropherogramme aus Detergenssolubilisaten von ganzen Bakterienzellen, extrahiert mit SDS (2 % w/v bei 100°C), in Abhängigkeit vom Wachstum

Abb. D: Marker-Proteine von oben nach unten: β-Galactosidase, Phosphorylase-B, BSA, Ovalbumin, Carbonic-Anhydrase, Trypsin-Inhibitor, Lysozym

SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt - Gelgradient 10 - 16 % Acrylamid (Trenngellängen 30 cm)

Abkürzungen: log-Phase: logarithmische Wachstumsphase
stat-Phase: stationäre Wachstumsphase


logOD
1
0
-1
-2
10
20
30
40
50 t(h)
A
PEp.A
B
PEp.C
PEp.D
PEp.B
pt
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
116.5 KD
94
68
43
30
21
14.3
B
C
D
14 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 51 t(h)
log-Phase
stat-Phase

Tafel 11 Proteolyse des HPI-Layer-Proteins in Abhängigkeit des Wachstums

Abb. A: Wachstumskurve einer Bakterienkultur aus *Deinococcus radiodurans* Sark

OD = optische Dichte
+ = Meßpunkte der zellgebundenen Proteinaseaktivität, gemessen mit Azocasein im Verlauf des Wachstums in (Unit. 10^{-2}/mg Zellprotein)
· = Meßpunkt der optischen Dichte einer Bakteriensuspension im Verlauf des Wachstums

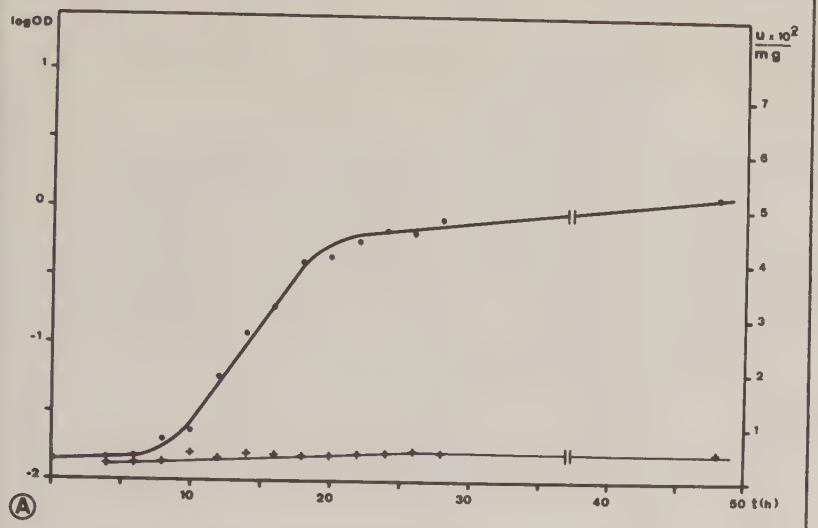
Abb. B: Elektropherogramme einer (60°C - SDS) HPI-Präparation Sark

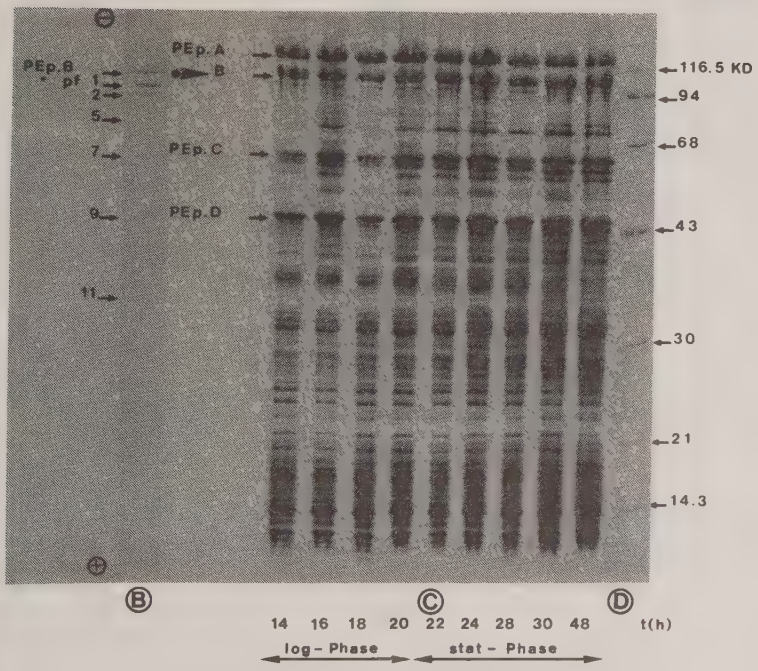
Abb. C: Elektropherogramme aus Detergenssolubilisaten von ganzen Bakterienzellen, extrahiert mit SDS (2 % w/v bei 100°C) in Abhängigkeit des Wachstums

Abb. D: Marker-Proteine (siehe Tafel 10, Abb. D)

SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt - Gelgradienten: 10 - 16 % Acrylamid (Trenngellänge: 30 cm)

Abkürzungen: log-Phase = logarithmische Wachstumsphase
stat-Phase = stationäre Wachstumsphase


logOD
1
0
-1
-2
u x 10²
mg
7
6
5
4
3
2
1
10
20
30
40
50 t(h)
A


⊖
PEp.B
pf
1
2
5
7
9
11
PEp.A
B
PEp.C
PEp.D
116.5 KD
94
68
43
30
21
14.3
⊕
B
C
D
14 16 18 20 22 24 28 30 48 t(h)
log - Phase
stat - Phase

Tafel 12 Wirksamkeit von Proteinase-Inhibitoren an ganzen Bakterienzellen von *Deinococcus radiodurans* R_1/Sark

Abb. A: Wirksamkeit von unterschiedlichen zweiwertigen metallischen Ionen (Inhibitoren der Metallo-Proteinasen) an ganzen Bakterienzellen von R_1 und Sark

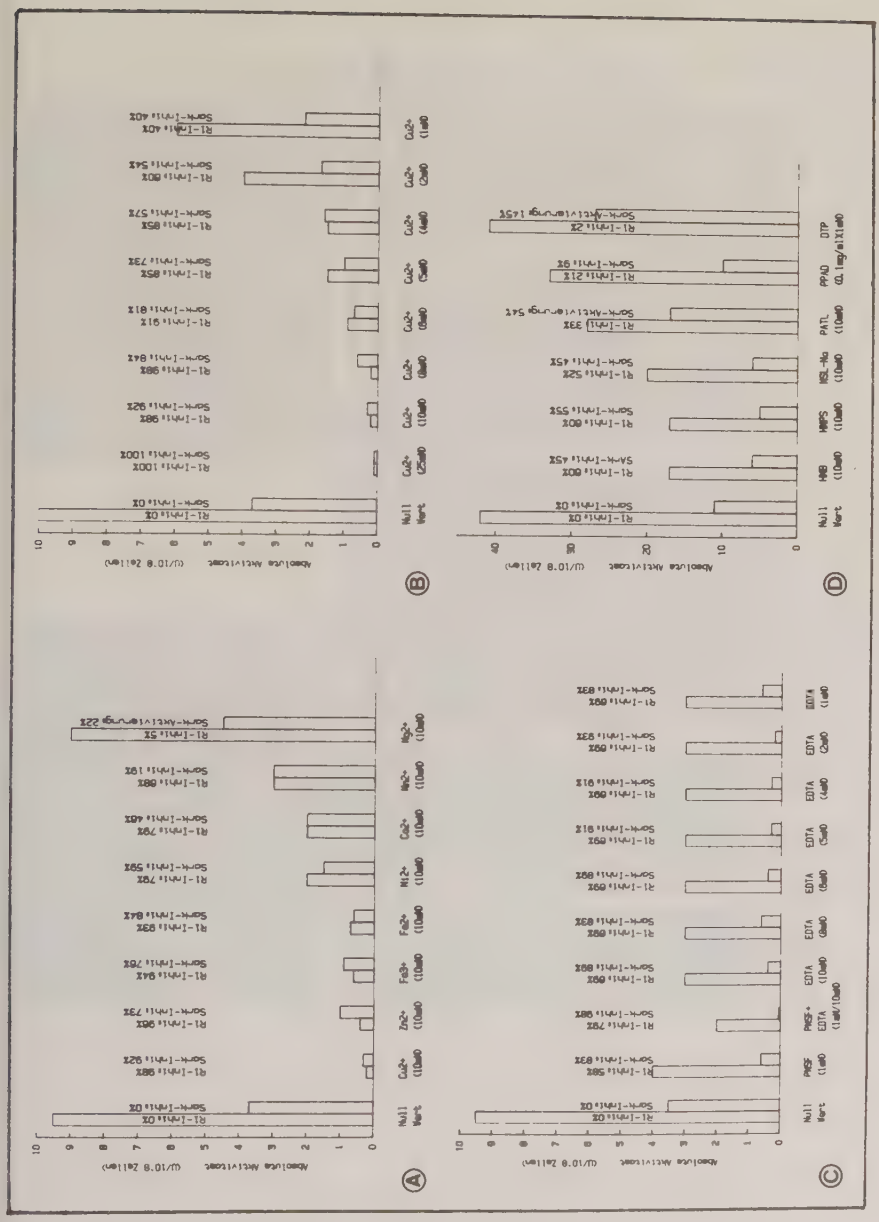
Abb. B: Wirksamkeit vom zweiwertigen metallischen Kupferion in Abhängigkeit von seiner Konzentration an ganzen Bakterienzellen von R_1 und Sark

Abb. C: Wirksamkeit eines Proteinase-Inhibitors der Metallo-Proteinasen (EDTA, in Abhängigkeit von seiner Konzentration) und eines der Serin-Proteinase (PMSF) an ganzen Bakterienzellen von R_1 und Sark

Abb. D: Wirksamkeit von Proteinase-Inhibitoren der Thiol-Proteinasen (HMB), (HMPS), (MSL-Na), (DTP) und der Metallo-Proteinasen (PATL), (PPAD) an ganzen Bakterienzellen und R_1 und Sark

Absolute Aktivität in $U/10^8$ Bakterienzellen, gemessen mit Azocasein.

Abkürzungen:
Inhi = Inhibierung (in Prozent, bezogen auf den Nullwert (ohne Inhibitor)
Akti = Aktivierung (idem)
EDTA = Ethylendiamin
PMSF = Phenylmethylsulfonylfluorid
HMB = p. Hydroxymercuribenzoat
HMPS = p. Hydroxymercuriphenylsulfonat
MSL-Na = Mersalylsäure-Na-Salz
DTP = Dithiopyridin
PATL = 1-10-Phenanthrolin
PPAD = Phosphoamidon


A
B
C
D
Null
Wort
CuSO4 (10mM)
CuSO4 (20mM)
CuSO4 (40mM)
CuSO4 (60mM)
CuSO4 (80mM)
CuSO4 (100mM)
PMSF (1mM)
PMSF+ EDTA (1mM/10mM)
EDTA (10mM)
EDTA (60mM)
EDTA (30mM)
EDTA (40mM)
EDTA (20mM)
EDTA (1mM)
ZnSO4 (10mM)
FeCl3 (10mM)
FeSO4 (10mM)
NiCl2 (10mM)
CoCl2 (10mM)
MnCl2 (10mM)
MgCl2 (10mM)
HMB (10mM)
MMPS (10mM)
MSL-Na (10mM)
PATL (10mM)
PPAD (0.1mg/ml)
DTP (10mM)
Absolute Activity (U/10^8 cells)
R1-Inh1 0%
Sarm-Inh1 0%
R1-Inh1 100%
Sarm-Inh1 100%
R1-Inh1 98%
Sarm-Inh1 92%
R1-Inh1 98%
Sarm-Inh1 84%
R1-Inh1 91%
Sarm-Inh1 81%
R1-Inh1 85%
Sarm-Inh1 73%
R1-Inh1 85%
Sarm-Inh1 57%
R1-Inh1 80%
Sarm-Inh1 54%
R1-Inh1 40%
Sarm-Inh1 40%
R1-Inh1 0%
Sarm-Inh1 0%
SA-Inh1 45%
R1-Inh1 80%
Sarm-Inh1 55%
R1-Inh1 52%
Sarm-Inh1 45%
R1-Inh1 33%
Sarm-Activity 54%
R1-Inh1 21%
Sarm-Inh1 9%
R1-Inh1 2%
Sarm-Activity 145%
R1-Inh1 0%
Sarm-Inh1 0%
R1-Inh1 98%
Sarm-Inh1 92%
R1-Inh1 98%
Sarm-Inh1 73%
R1-Inh1 94%
Sarm-Inh1 76%
R1-Inh1 84%
Sarm-Inh1 84%
R1-Inh1 79%
Sarm-Inh1 59%
R1-Inh1 79%
Sarm-Inh1 46%
R1-Inh1 68%
Sarm-Inh1 19%
R1-Inh1 5%
Sarm-Activity 22%
R1-Inh1 0%
Sarm-Inh1 0%
R1-Inh1 98%
Sarm-Inh1 92%
R1-Inh1 98%
Sarm-Inh1 83%
R1-Inh1 79%
Sarm-Inh1 98%
R1-Inh1 89%
Sarm-Inh1 89%
R1-Inh1 89%
Sarm-Inh1 89%
R1-Inh1 89%
Sarm-Inh1 89%
R1-Inh1 89%
Sarm-Inh1 91%
R1-Inh1 89%
Sarm-Inh1 91%
R1-Inh1 89%
Sarm-Inh1 89%
R1-Inh1 89%
Sarm-Inh1 83%

Tafel 13 Wirksamkeit von zwei Proteinase-Inhibitoren (Cu^{++}/PMSF), getestet an der Präparation des HPI-Layers

Abb. A: HPI-Layer aus Stamm R_1, einseitig bedampft mit Ta/W nach Lufttrocknung. (S) smooth surface = Außenseite des Layers; (R) rough surface = Innenseite des Layers. Beide unterschiedlichen Seiten des Layers sind dargestellt

Abb. B: HPI-Layer aus Stamm Sark, einseitig bedampft, idem Abb. A

NB: Beide Layer wurden bei 60°C in Anwesenheit von SDS gewonnen

Abb. C: Elektropherogramm einer 60°C-SDS-HPI-Präparation R_1 (von links nach rechts Konzentrationszunahme der Probe)

Abb. D: Elektropherogramm einer 60°C-Cu^{++}/SDS-HPI-Präparation R_1 (von links nach rechts Konzentrationszunahme der Probe)

Abb. E: Elektropherogramm einer 60°C-SDS-HPI-Präparation Sark

Abb. F: Elektropherogramm einer 5°C-Cu^{++}/LiDS-HPI-Präparation Sark (von links nach rechts Konzentrationszunahme der Probe)

Abb. G: Elektropherogramm einer 60°C-Cu^{++}/SDS-HPI-Präparation Sark - Inkubationszeitreihe in kochender SDS-Lösung (Zeit der Inkubationsdauer in min)

Abb. H: Elektropherogramm einer 60°C-PMSF/SDS-HPI-Präparation (Inkubationsdauer in kochender SDS-Lösung: links 3 min, rechts 15 min)

SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt - Gelgradient 10 - 16 % Acrylamid. Trenngellänge 30 cm

NB: Abb. C und E: Die HPI-Layer wurden ohne Proteinase-Inhibitor präpariert.

Tafel 14 Morphologie der Zellwände und der Pink Envelope. Vergleich mit den Stämmen R_1 und Sark (ohne Triton-Behandlung der Zellwände)

Abb. A und B: Ultradünnschnitte aus Zellwänden von R_1 (Abb. A) und Sark (Abb. B) mit cytoplasmatischer Membrankontamination

Abb. C, D, E und F: Ultradünnschnitte aus Pink Envelope von R_1 (Abb. C = Übersicht, Abb. D) und Sark (Abb. E = Übersicht, Abb. F) mit cytoplasmatischer Membrankontamination

Ultradünnschnitte: Abb. A bis F:

Fixierung: OsO_4/Rutheniumrot
Nachkontrastierung: $Pb(OH)_2$

Abb. G und H: Pink Envelope aus R_1 (Abb. G) und aus Sark (Abb. H) Die Vesikel der äußeren Membran sind mit einem Pfeilkopf gekennzeichnet.
Negativkontrastierung: Phosphorwolframsäure

Erzeugte Moirè-Muster und Faltkanten des HPI-Layers sind gut sichtbar

A
B
C
D
E
F
G
H

Tafel 15 Morphologie der Zellwände und der Pink Envelope. Vergleich mit den Stämmen R_1 und Sark (mit Triton-Behandlung der Zellwände)

(Trennung der Zellwände von cytoplasmatischer Membran)

Abb. A und B: Ultradünnschnitte aus Zellwänden von R_1 (Abb. A) und Sark (Abb. B) ohne cytopalsmatische Membrankontamination

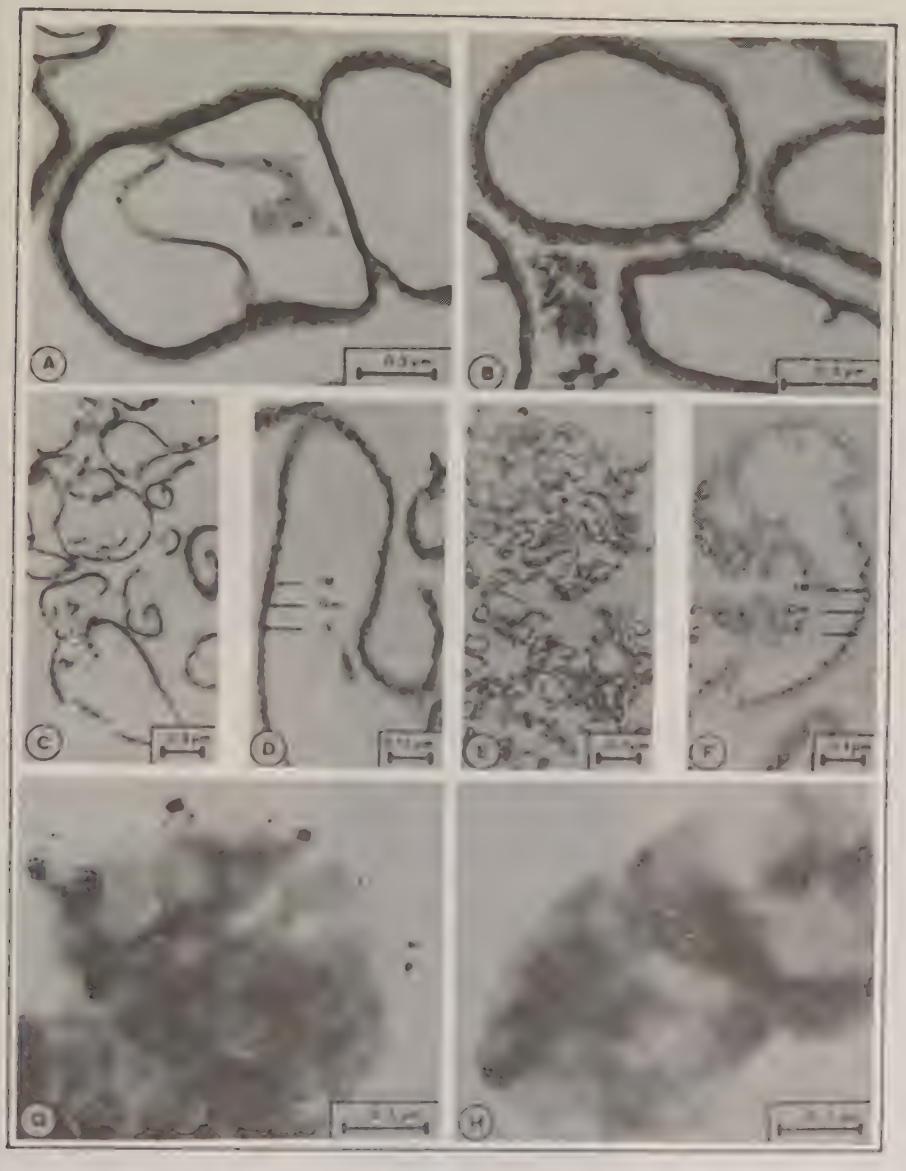
Abb. C, D, E. F: Ultradünnschnitte aus Pink Envelope von R_1 (Abb. C = Übersicht, Abb. D) und Sark (Abb. E = Übersicht, Abb. F) ohne cytoplasmatische Membrankontamination

Ultradünnschnitte: Abb. A bis F:

Fixierung: OsO_4/Rutheniumrot
Nachkontrastierung: Uranylacetat/Bleicitrat

Abb. G und H: Pink Envelope aus R_1 (Abb. G) und aus Sark (Abb. H)
Die Vesikel der äußeren Membran sind nicht anwesend

Negativkontrastierung: Phosphorwolframsäure
Erzeugte Moiré-Muster sind gut sichtbar


A
B
C
D
E
F
G
H

Tafel 16 Elektrophoretische Untersuchung der Zellwände und der Pink Envelope nach der Triton-Behandlung und Entfernung der cytoplasmatischen Membran (Stamm Sark)

Abb. A: Pink Envelope (ohne cytoplasmatische Membrankontamination)
Negativkontrastierung: Phosphorwolframsäure

Abb. B: Ultradünnschnitt einer Pink Envelope (ohne cytoplasmatische Membrankontamination)
Fixierung: OsO_4/Rutheniumrot
Nachkontrastierung: Uranylacetat/Bleicitrat

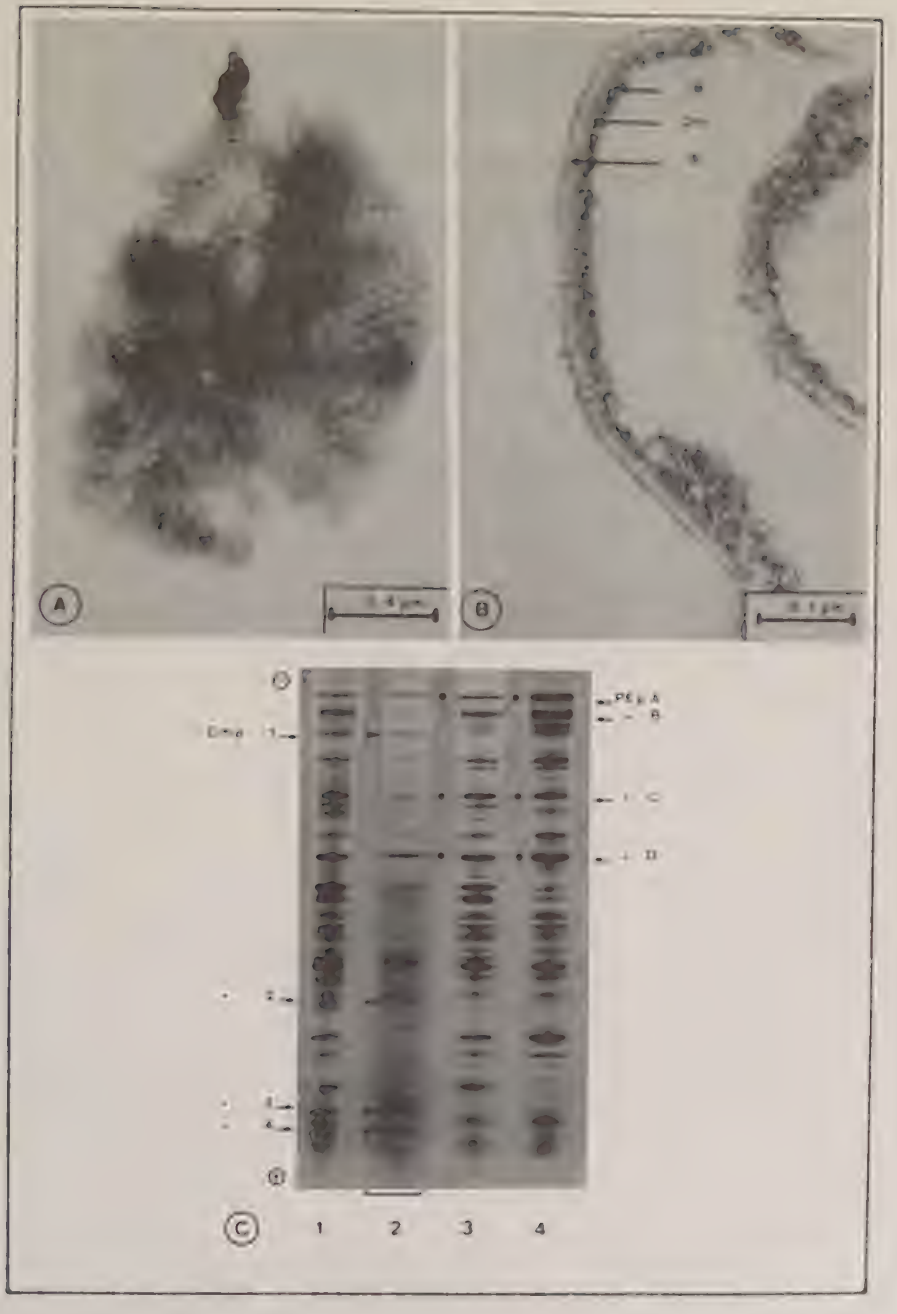
Abb. C: Bahn 1: Elektropherogramm der Zellwandproteine mit cytoplasmatischer Membrankontamination

Bahn 2: Elektropherogramm des Tritonsolubilisats aus den Zellwänden
Die Pfeilköpfe deuten auf die Polypeptidbanden, die der cytoplasmatischen Membran zugeordnet werden (Cmp 1, 2, 3 und 4)

Bahn 3: Elektropherogramm der Zellwände ohne cytoplasmatische Membrankontamination

Bahn 4: Elektropherogramm der Pink Envelope ohne cytoplasmatische Membrankontamination
Die schwarzen Punkte deuten auf PEp-Hauptprotein als Orientierungshilfe

SDS-PAGE mit Silber gefärbt - Gelgradient 10 - 16 % Acrylamid - Trenngellänge 14 cm


A
B
C
1
2
3
4

Tafel 17 Infrarot-Spektroskopie: Vergleich der Infrarot-Spektren aus Zellwänden, Pink Envelope und Zellwänden, Pink Envelope nach Entfernung der cytoplasmatischen Membran

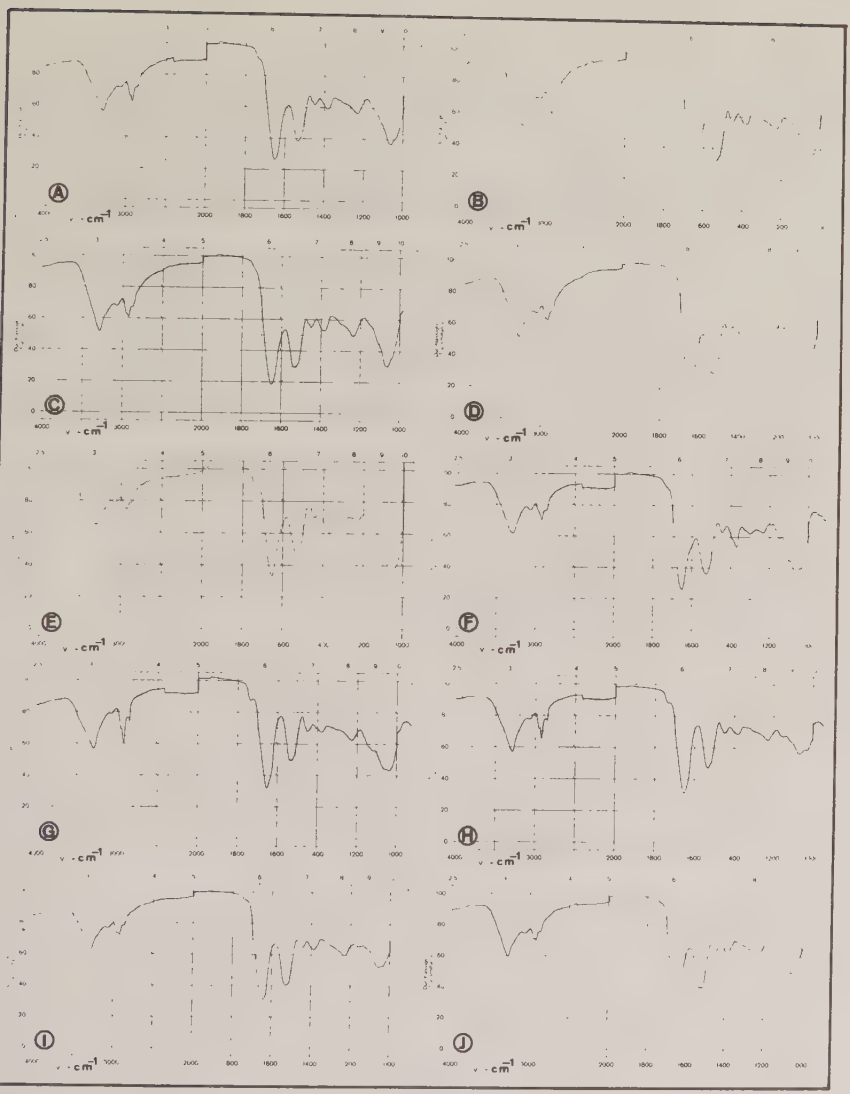
Abb. A, B: Infrarot-Spektren der Zellwände von R_1 (Abb. A) und Sark (Abb. B)

Abb. C, D: Infrarot-Spektren der Zellwände (nach einer Triton X-100-Behandlung) von R_1 (Abb. C) und Sark (Abb. D)

Abb. E, F: Infrarot-Spektren der isolierten Murein-Sacculi (nach einer SDS-Extraktion der Zellwände bei 100°C) von R_1 (Abb. E) und Sark (Abb. F)

Abb. G, H: Infrarot-Spektren der Pink Envelope (isoliert aus Zellwänden, nicht mit Triton behandelt) von R_1 (Abb. G) und Sark (Abb. H)

Abb. I, J: Infrarot-Spektren der Pink Envelope (isoliert aus Zellwänden mit Triton behandelt) von R_1 (Abb. I) und Sark (Abb. H)


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
ν - cm⁻¹

Tafel 18 Infrarot-Spektroskopie (Stamm Sark)

Abb. A: Infrarot-Spektrum des Detergens Triton X-100

Abb. B: Infrarot-Spektrum des Detergenssolubilisats (Triton X-100) aus der Extraktion von Zellwänden zur Entfernung der cytoplasmatischen Membrankontamination

Abb. C: Infrarot-Spektrum des Lysozymhydrolysats nach Abbau des Mureins aus Zellwänden (nach Entfernung der cytoplasmatischen Membrankontamination)

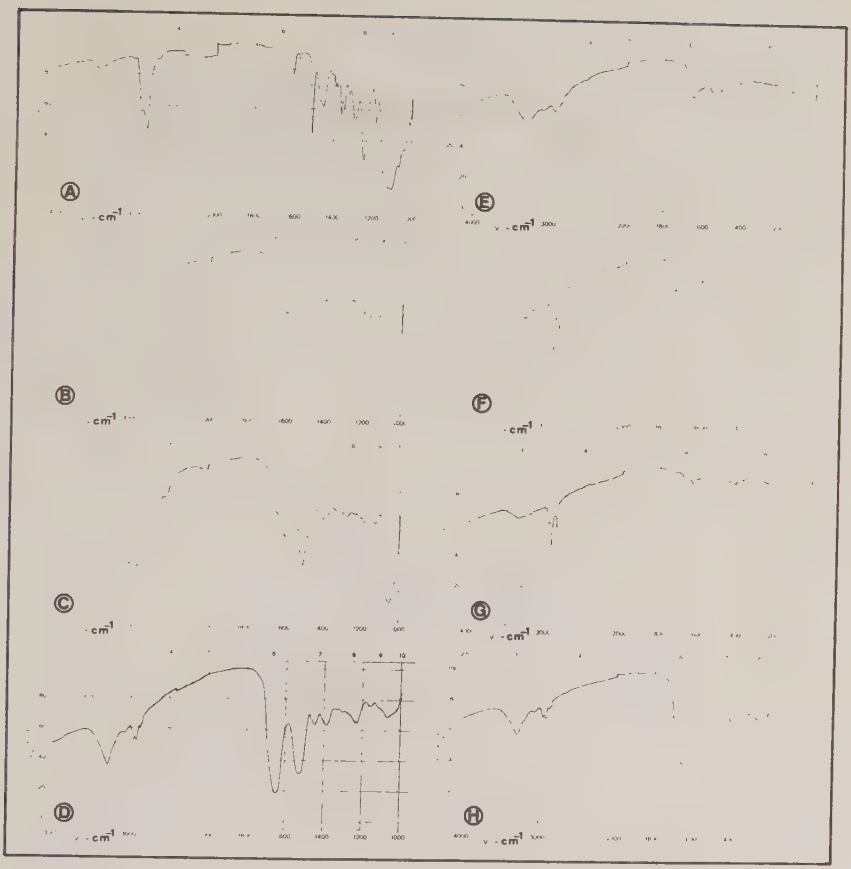
Abb. D: Infrarot-Spektrum der Pink Envelope (isoliert aus Zellwänden mit Triton behandelt)

Abb. E: Infrarot-Spektrum der wässerigen Phase der Phenol-Extraktion (bei 65°C) an der Pink Envelope

Abb. F: Infrarot-Spektrum der Chloroform/Methanol-Phase nach der Lipid-Extraktion der Pink Envelope (isoliert aus Zellwänden, nicht mit Triton behandelt)

Abb. G: idem Abb. F, außer daß die extrahierte Pink Envelope aus Zellwänden, mit Triton behandelt, isoliert wurde

Abb. H: Infrarot-Spektrum der Pink Envelope nach Lipid-Extraktion mit Chloroform/Methanol


A
B
C
D
E
F
G
H

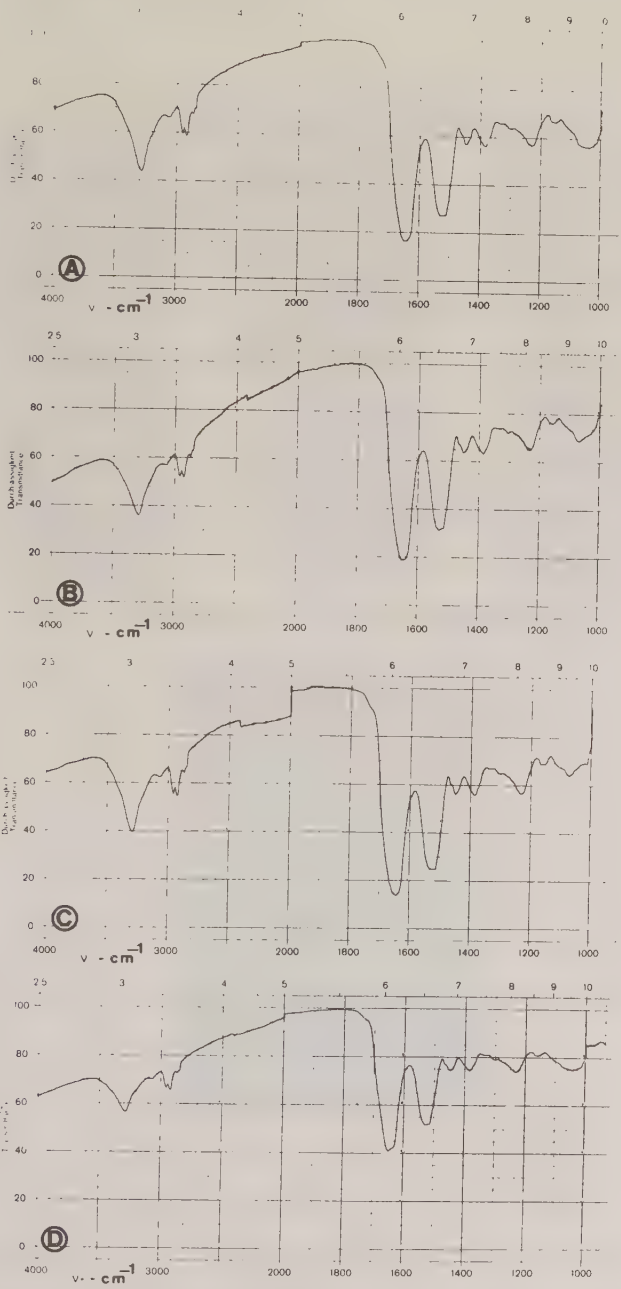
Tafel 19 Infrarot Spektroskopie: Vergleich der Pink Envelope Spektren aus den Stämmen R_1, Sark, Sark (CL^-) und Sark (HPI^-)

Abb. A: Infrarot-Spektrum der Pink Envelope von R_1

Abb. B: Infrarot-Spektrum der Pink Envelope aus Sark

Abb. C: Infrarot-Spektrum der Pink Envelope aus der Mutante Sark (CL^-)

Abb. D: Infrarot-Spektrum der Pink Envelope aus der Mutante Sark (HPI^-)


A
B
C
D
ν - cm⁻¹
4000
3000
2000
1800
1600
1400
1200
1000

Tafel 20 Vergleich der Elektrophorese aus den Zellwänden und Pink Envelope von R_1 und Sark

Abb. A, B, C: Bahn 1: Elektropherogramm der Zellwand (mit cytoplasmatischer Membrankontamination)

Bahn 2: Elektropherogramm der Zellwand (ohne cytoplasmatische Membrankontamination)

Bahn 3: Elektropherogramm der Pink Envelope (ohne cytoplasmatische Membrankontamination)

Abb. A: Stamm R_1; Abb. B: Stamm Sark;

Abb. C: Stamm Sark (CL^-)

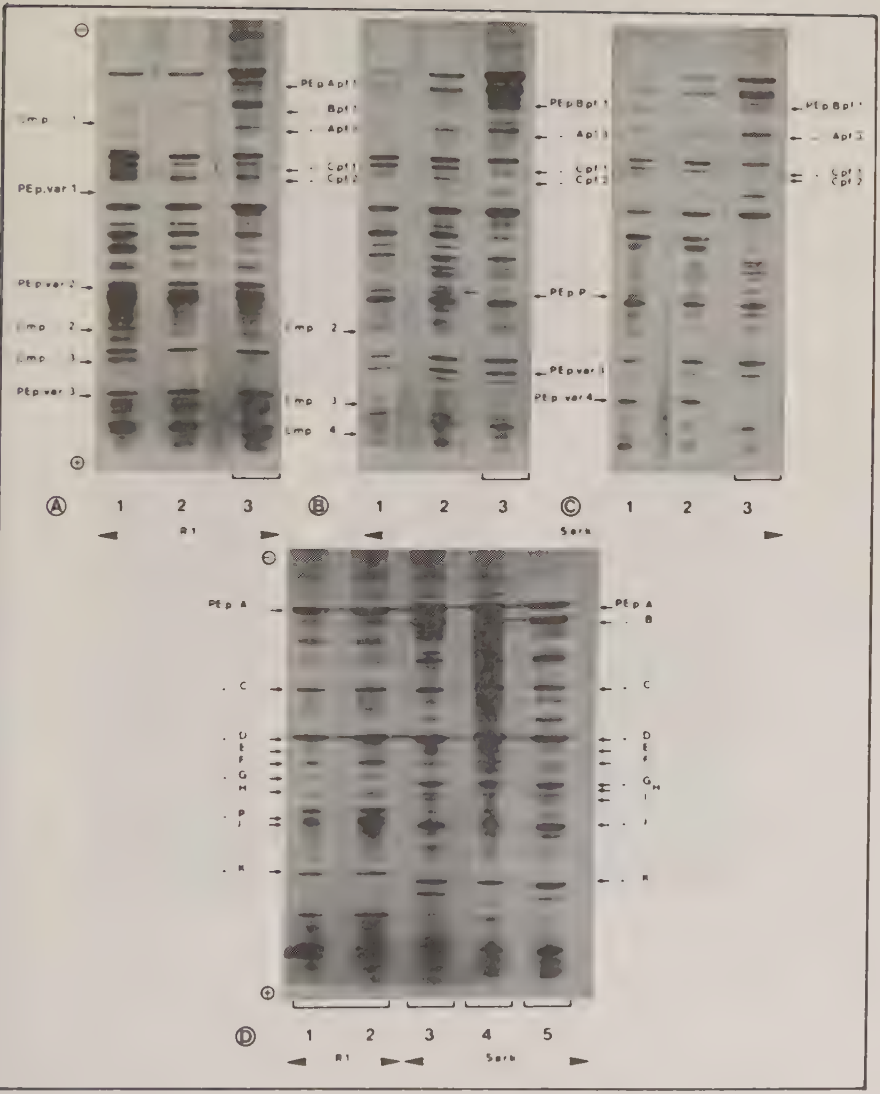
Abb. D: Bahn 1-2: idem Abb. A, Bahn 3 (R_1)

Bahn 3: idem Abb. B, Bahn 3 (Sark)

Bahn 4: Elektropherogramm der Pink Envelope aus Sark (HPI^-)

Bahn 5: idem Abb. C, Bahn 3 (Sark (CL^-))

SDS-PAGE mit Silber gefärbt - Gelgradient 10 - 16 % Acrylamid - Trenngellänge 14 cm


PEp.var 1
PEp A
C
D
K
1
2
3
4
5

Tafel 21 Vergleich der Elektropherogramme der Pink Envelope aus R_1 und Sark. Entfernung von Lysozym aus der Pink Envelope

Abb. A:

Bahn 1 bis 3 und 6: Elektropherogramme der Pink Envelope von R_1 (Lysozym-kontaminiert)

Bahn 4 und 5: Elektropherogramme der Zellwand (ohne cytoplasmatische Membrankontamination) von R_1

Abb. B:

Bahn 1, 2, 4, und 5: Elektropherogramme der Pink Envelope von Sark (Lysozym-kontaminiert)

Bahn 3: Elektropherogramme der Zellwand (ohne cytoplasmatische Membrankontamination) von Sark

SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt - Gelgradient 10 - 16 % Acrylamid - Trenngellänge 30 cm

Abb. C, D, E:

Bahn 1: Elektropherogramm der Pink Envelope

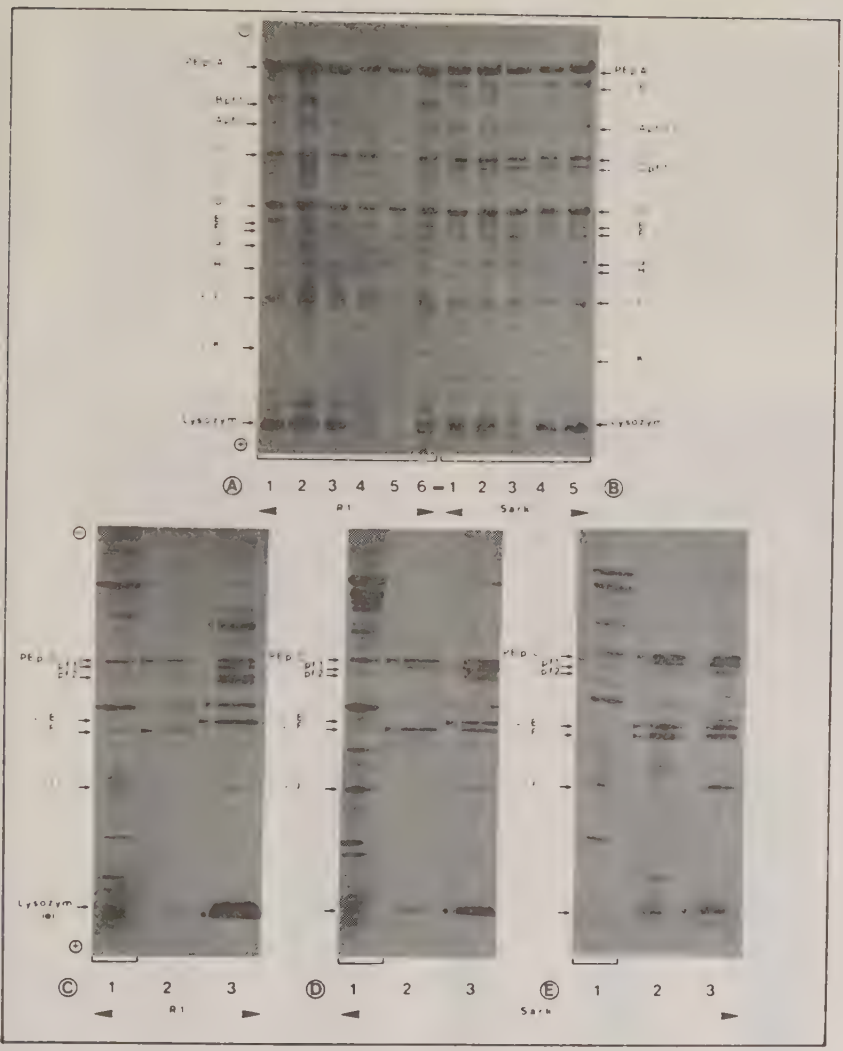
Bahn 2: Elektropherogramm des Lysozymhydrolysats (erhalten nach der Verdauung des Mureins der Zellwände)

Bahn 3: Elektropherogramm des Solubilisats, erzielt mit 0.2 M KCl an der Pink Envelope

Abb. C: Stamm R_1, Abb. D: Stamm Sark,
Abb. E: Stamm Sark (CL^-)

SDS-PAGE mit Silber gefärbt - Gelgradient: 10 - 16 % Acrylamid

Die schwarzen Punkte deuten auf Lysozymbanden
Die Pfeilköpfe deuten auf identifizierte PEp-Proteine in dem Bandenmuster anhand der Mobilität


A 1 2 3 4 5 6 – 1 2 3 4 5 B
R1
Sark
C 1 2 3
R1
D 1 2 3
E 1 2 3
Sark

Tafel 22 Homologie-Studie: Eindimensionale Peptide Maps aus PEp-Proteinen

Abb. A:
Abb. B: Bahn 2 bis 8, Elektropherogramme einiger isolierter
Bahn 2 bis 10: PEp-Polypeptide aus PAG. Geprüft auf deren Reinheitsgrad für Peptide Mapping-Studie

Abb. A: PEp-Polypeptide aus Stamm R_1

Abb. B: PEp-Polypeptide aus Stamm Sark

Bahn 1 (Abb.A): Elektropherogramm der Pink Envelope (mit Lysozym) aus R_1

Bahn 2 (Abb.B): Elektropherogramm der Pink Envelope (mit Lysozym) aus Sark

Abb. C:
Abb. D: Bahn 2 bis 8, Elektropherogramme der Peptide Maps
Bahn 2 bis 10: einiger isolierter PEp-Polypeptide (siehe Abb. A, B)

Abb. C: Stamm R_1

Abb. D: Stamm Sark

Bahn 1 (Abb. C) = Bahn 1 (Abb. A); Bahn 1 (Abb. D) = Bahn 1 (Abb. B)

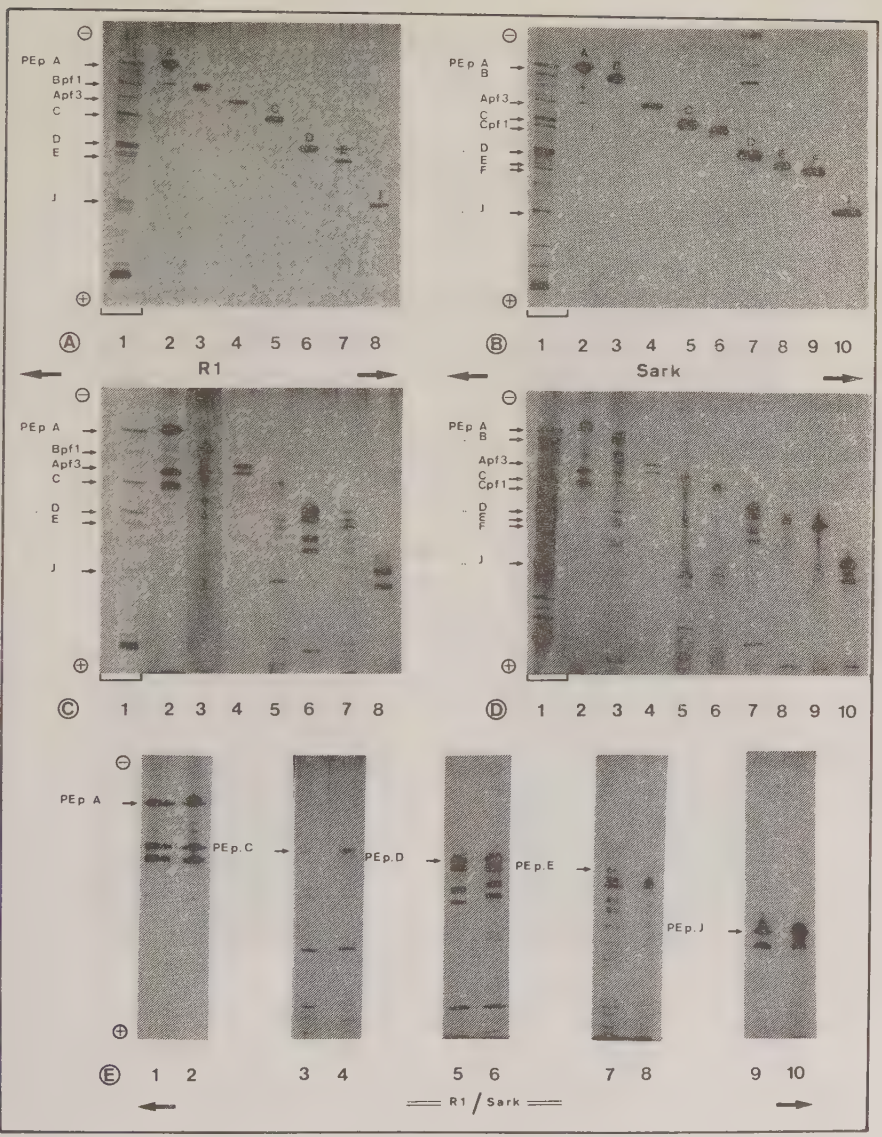
(Bahnbezeichnung siehe Abb. A, B)

Abb. E: Bahn 1 - 2: Elektropherogramme des Peptide Map aus PEp A
Bahn 3 - 4: Elektropherogramme des Peptide Map aus PEp C
Bahn 5 - 6: Elektropherogramme des Peptide Map aus PEp D
Bahn 7 - 8: Elektropherogramme des Peptide Map aus PEp E
Bahn 9 - 10: Elektropherogramme des Peptide Map aus PEp J

Bahn 1, 3, 5, 7, 9: Stamm R_1

Bahn 2, 4, 6, 8, 10: Stamm Sark

SDS-PAGE mit Silber gefärbt, Gelgradient 10 - 16 % Acrylamid, Trenngellänge 14 cm


PEp A
Bpf1
Apf3
C
D
E
J
A
1 2 3 4 5 6 7 8
PEp A B
Apf3
C Cpf1
D E F
J
A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
R1
PEp A
Bpf1
Apf3
C
D E
J
1 2 3 4 5 6 7 8
Sark
PEp A B
Apf3
C Cpf1
D E F
J
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
PEp A
PEp.C
PEp.D
PEp.E
PEp.J
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
R1 / Sark

Tafel 23 Homologie-Studie: Zweidimensionale Peptide Maps aus PEp-Proteinen

Abb. A, B: Bahn 1 (Abb. A): Elektropherogramm des HPI-Layers (R_1)
Bahn 1 (Abb. B): Elektropherogramm des HPI-Layers (Sark)
(beide HPI-Layer mit SDS bei 60°C präpariert)

Bahn 2: Elektropherogramm des zweidimensionalen Peptide Map aus Zellwänden (ohne cytoplasmatische Membrankontamination)

1. Dim: Die erste Geldimension gilt als Orientierungshilfe zur Identifizierung der einzelnen PEp-Peptide Maps in der 2. Dimension (2. Dim)

Abb. A (Stamm R_1); Abb. B (Stamm Sark)

Abb. C, D: Bahn 1 (Abb. A): Elektropherogramm der Pink Envelope (R_1)
Bahn 1 (Abb. B): Elektropherogramm der Pink Envelope (Sark)

Bahn 2: Elektropherogramm des zweidimensionalen Peptide Map aus Pink Envelope

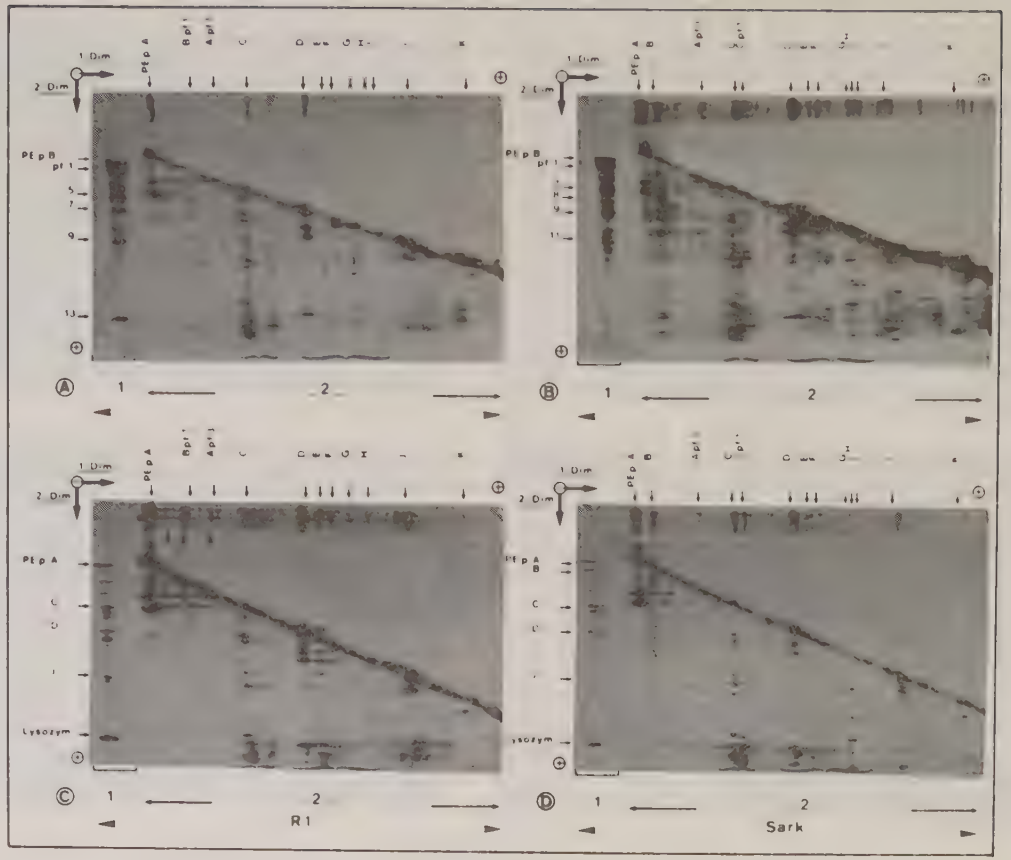
1. Dim und 2. Dim (siehe Erläuterung in Abb. A, B)

Abb. C (Stamm R_1); Abb. D (Stamm Sark)

SDS-PAGE 1. Dim: mit Coomassie gefärbt. Gelgradient:
10 - 16 % Acrylamid, Trenngellänge 30 cm

SDS-PAGE 2. Dim: mit Silber gefärbt. Gelgradient:
10 - 16 % Acrylamid, Trenngellänge 14 cm

NB: In Abb. A und B (Bahn 1 jeweils) sind die HPI-Layer-Elektropherogramme aus Präparationen ohne Proteinase-Inhibitor gewonnen


1 Dim
2 Dim
PEp A
Bpr 1
Apr 1
PEp B
pr 1
5
7
9
13
Lysozym
A
B
C
D
1
2
R1
Sark

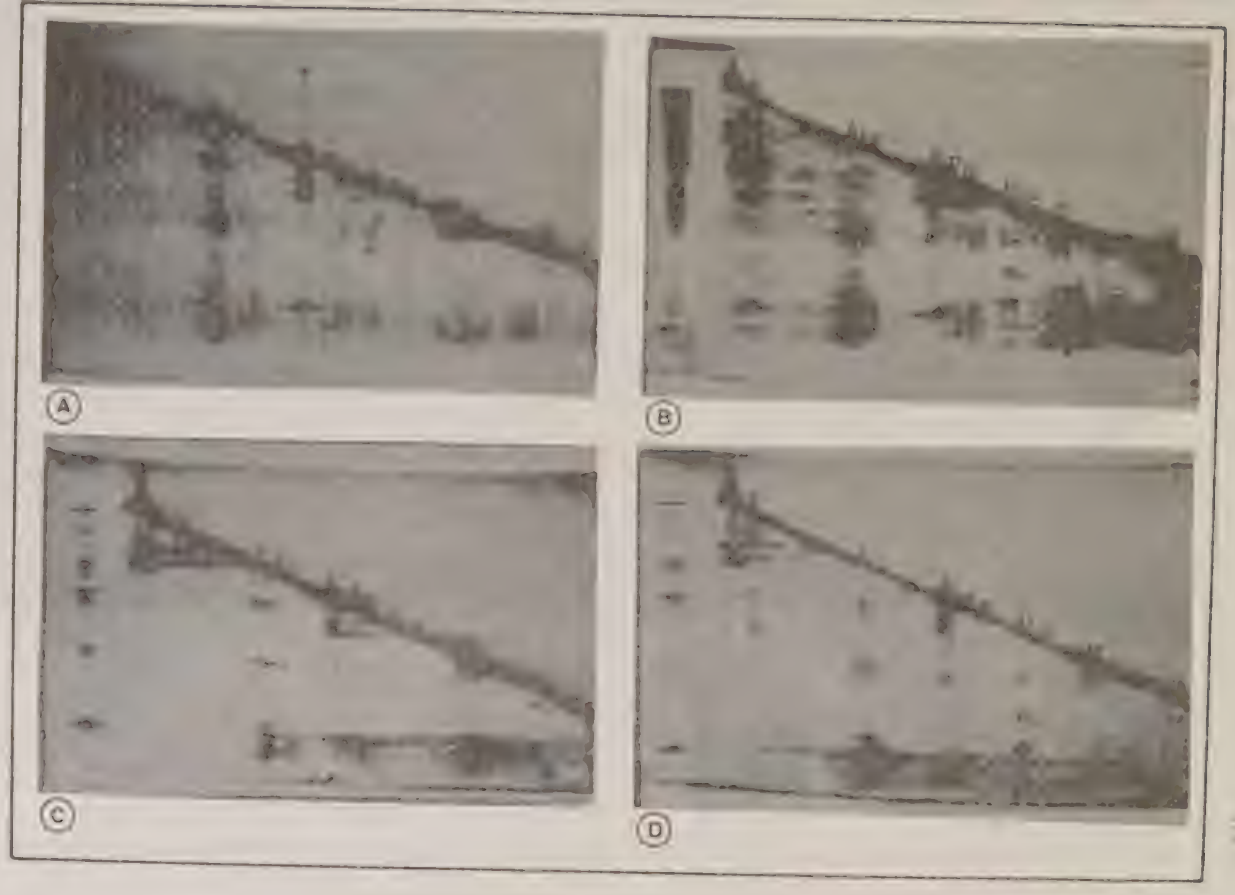
Tafel 24 Homologie-Studie: Zweidimensionale Peptide Maps aus PEp-Proteinen. Digitale Verarbeitungen mit GELKORIX

Abb. A bis D: Display-Bilder der zu verarbeitenden zweidimensionalen Peptide Maps.
Für die Identifizierung der Gele siehe Tafel 23

Die Kolonnenzahlen (auf der Diagonale) jedes zweidimensionalen Peptide Map korrespondieren zu denen in den jeweiligen Tabellen (siehe Tafel 25).

Die Kolonnen, die verarbeitet wurden, sind mit X-Zeichen in der Diagonale gekennzeichnet.
Die Bandenpositionen in einer Kolonne sind mit +-Zeichen gekennzeichnet.

(Diese Aufnahmen wurden von einem Fernsehbild gemacht)


A
B
C
D

Tafel 25 Homologie-Studie: Zweidimensionale Peptide Maps aus PEp-Proteinen. Digitale Verarbeitungen mit GELKORIX: Korrelationswert der Kolonnen

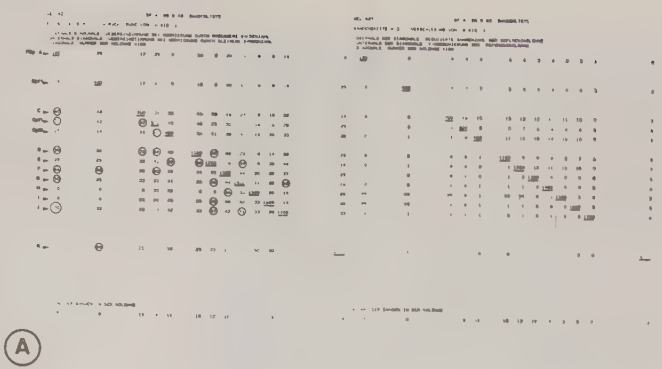
Abb. A bis D: Korrelationsberechnungen, erzielt für die jeweiligen zweidimensionalen Peptide Maps, siehe Tafel 23 und 24 Abb. A bis D (jeweils linke Tabelle)

Abb. A: zweidimensionales Peptide Map aus Zellwand (R_1)
Abb. B: zweidimensionales Peptide Map aus Zellwand (Sårk)
Abb. C: zweidimensionales Peptide Map aus Pink Envelope (R_1)
Abb. D: zweidimensionales Peptide Map aus Pink Envelope (Sårk)

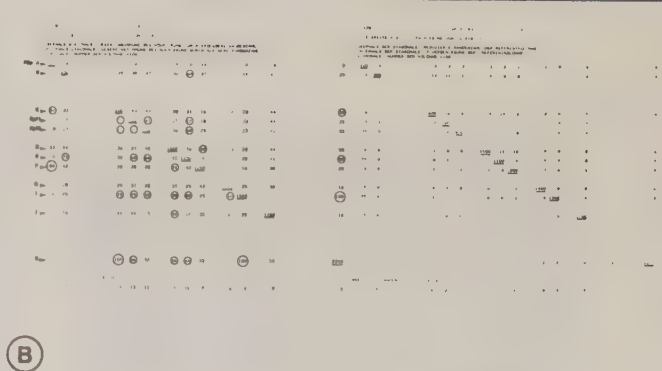
Zur Erläuterung der Tabellen siehe 2.7.5.3

Die Kolonnennummern sind mit X 100 multipliziert und unterstrichen.

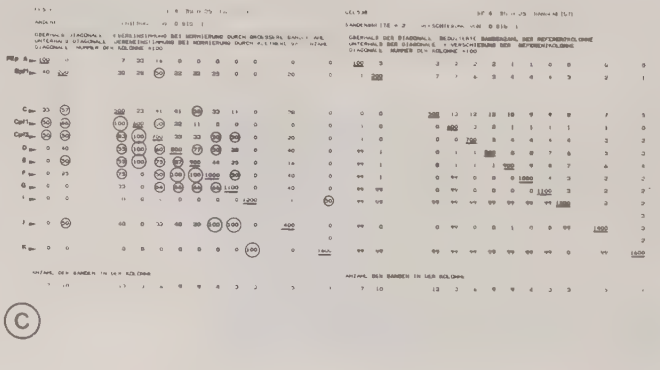
Die Korrelationswerte, die von Bedeutung sind (d.h. $\geq$ 50 %), sind schwarz umrandet.



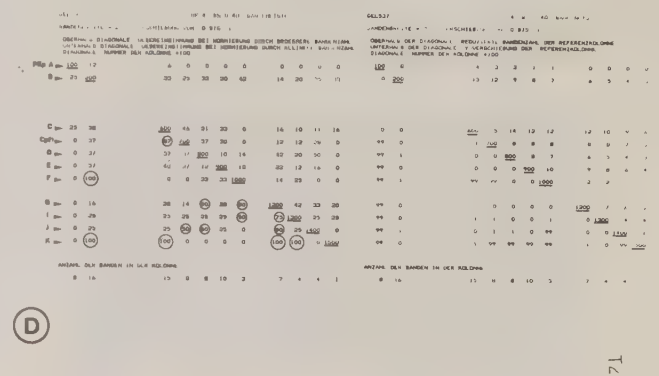
A



B



C



D

Tafel 26 Homologie-Studie: Ein- und zweidimensionale Peptide-Maps des PEp B-Proteins (das HPI-Layer-Protein)

Abb. A: Eindimensionale Peptide Maps

Bahn 1 - 8: Elektropherogramme der Pinke Envelope (Sark)

Bahn 2 - 12: Elektropherogramme der Peptide Maps aus PEp B pf 13 aus dem HPI-Layer-Protein R_1

Bahn 3: Elektropherogramm des Peptide Map aus PEp B aus dem HPI-Layer-Protein R_1

Bahn 9: Elektropherogramm des Peptide Map aus PEp B aus dem HPI-Layer-Protein R_1

Bahn 4,5,6, 10,11: Elektropherogramme der Peptide Maps aus PEp B aus dem HPI-Layer-Protein Sark

Bahn 7: Elektropherogramme der Peptide Maps aus PEp B pf 1 aus dem HPI-Layer-Protein Sark

Abb. B,C,D: Zweidimensionale Peptide Maps

Bahn 1 (Abb. B): Elektropherogramm des HPI-Layer-Proteins (R_1)

Bahn 1 (Abb.C-D): Elektropherogramm des HPI-Layer-Proteins (Sark)

(beide HPI-Layer in Abb. B und C wurden bei 60°C mit SDS ohne Inhibitorzusatz gewonnen, der in Abb. D wurde mit PMSF (2 mM) präpariert).

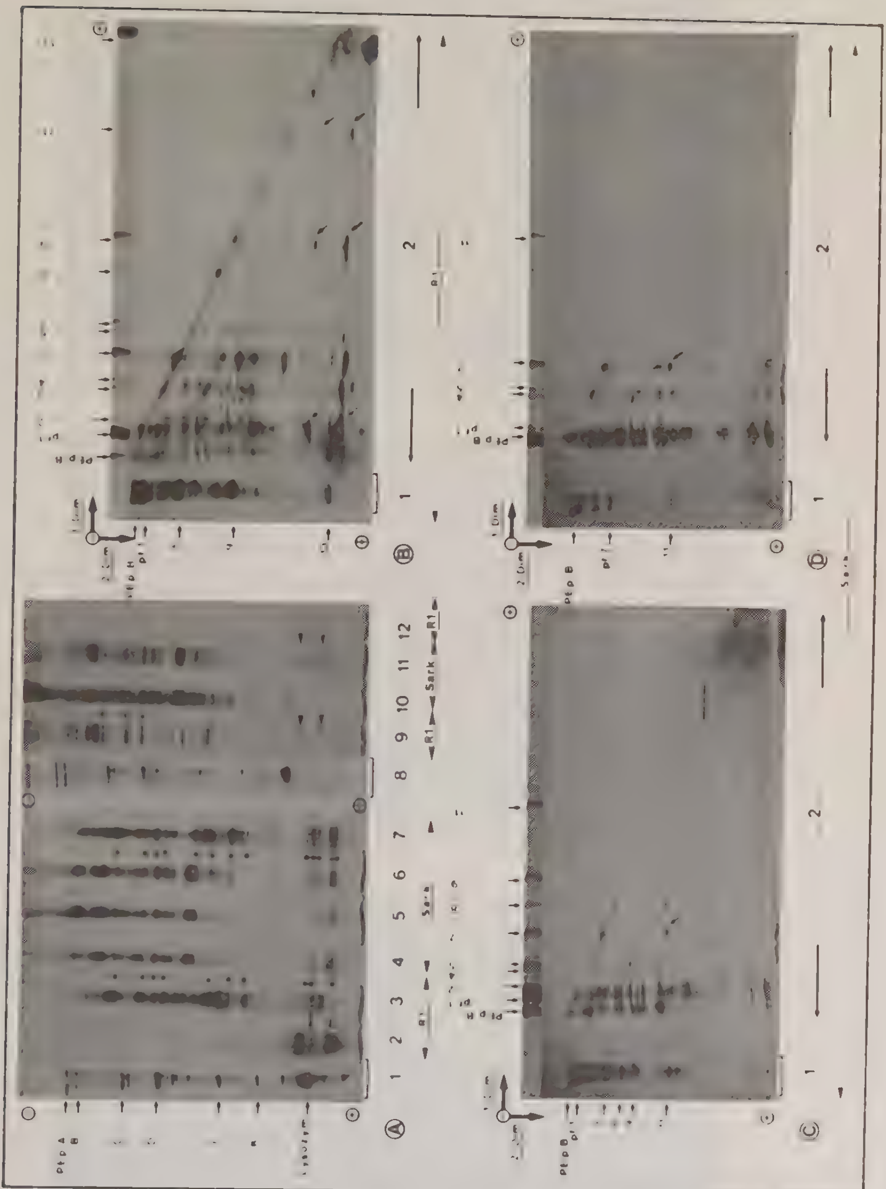
Bahn 2: Elektropherogramme der zweidimensionalen Peptide Maps der jeweiligen HPI-Layer-Proteine

1. Dim: Die erste Dimension gilt als Orientierungshilfe zur Identifikation der einzelnen PEp-Peptide-Maps in der zweiten Dimension (*2. Dim*).

SDS-PAGE *1. Dim* mit Coomassie gefärbt. Gelgradient 10 - 16 % Acrylamid, Trenngellänge 30 cm

SDS-PAGE *2. Dim* mit Silber gefärbt. Gelgradient idem *1. Dim*, Trenngellänge 14 cm (Abb. A idem)

NB: Für die Bezeichnungen der proteolytischen Fragmente der HPI-Layer-Proteine siehe Kap. 3.1.2.3 und Tabelle 3


A
B
C
D
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
R1
Sark
R1
1 Dim
2 Dim
Pep H
Pep B

Tafel 27 Homologie-Studie: Zweidimensionale Peptide Maps des PEp-Proteins (PEp B) und digitale Verarbeitungen mit GELKORIX

Abb. A bis C: Display-Bilder der zu verarbeitenden zweidimensionalen Peptide Maps.
Für die Identifizierung der Gele siehe Tafel 26, Abb. B, C und D.

Die Kolonnenzahlen (auf der Diagonale) jeder zweidimensionalen Peptide Map korrespondieren mit denen in den jeweiligen Tabellen (siehe Tafel 28).

Die Kolonnen, die verarbeitet wurden, sind mit X-Zeichen in der Diagonale gekennzeichnet.

Die Bandenposition in einer Kolonne sind mit +-Zeichen gekennzeichnet.

(Diese Aufnahmen wurden von einem Fernsehbild gemacht)

A
B
C

Tafel 28 Homologie-Studie: Zweidimensionale Peptide-Maps des PEp-Proteins (PEp B) und digitale Verarbeitungen mit GELKORIX

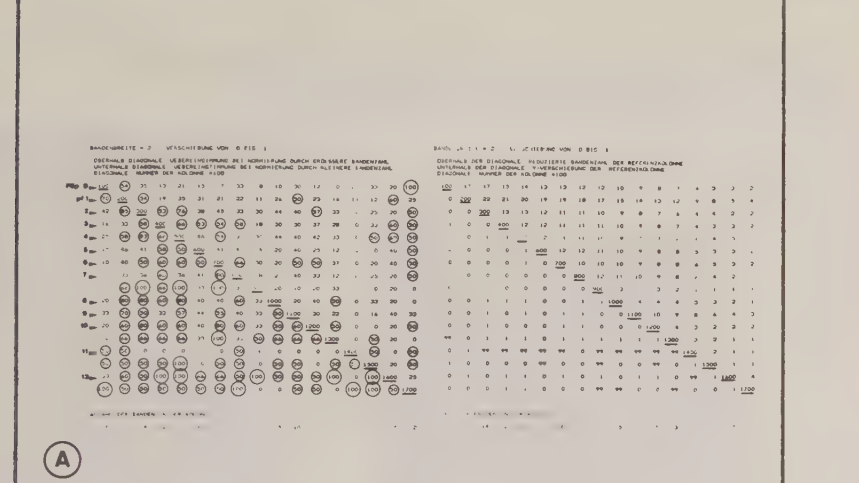
Abb. A bis C: Korrelationsberechnungen, erzielt für die jeweiligen zweidimensionalen Peptide Maps (siehe Tafel 26, Abb. B, C, D)

Abb. A: zweidimensionaler Peptide Map aus PEp B (HPI-Layer)-Protein R_1

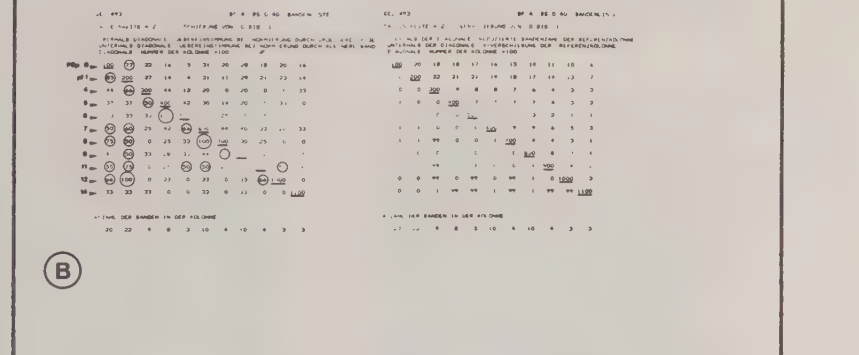
Abb. B: zweidimensionaler Peptide Map aus PEp B (HPI-Layer)-Protein Sark

Abb. C: zweidimensionaler Peptide Map aus PEp B (HPI-Layer)-Protein Sark (mit Inhibitor präpariert)

Zur Erläuterung der Tabellen siehe 2.7.5.3.
Die Kolonnennummern sind mit X 100 multipliziert und unterstrichen.
Die Korrelationswerte, die von Bedeutung sind (d.h. $\geq$ 50 %), sind schwarz umrandet.



A



B

C

Tafel 29 Homologie-Studie: Begrenzte Proteolyse in vitro des HPI-Layers: Proteine aus Sark und R_1 mit kommerziellen Proteinasen und Proteinase (PEp P) aus R_1

Abb. A, B: Begrenzte Proteolye in vitro an dem HPI-Layer-Protein (in der nicht dissoziierten Form, präpariert mit PMSF in SDS bei 60°C, auch in Abb. C, D) (Abb. A (R_1) , Abb. B (Sark)).

Bahn 1: Elektropherogramm des HPI-Layers (Kontroll-Lauf)

Bahn 2: Elektropherogramm des HPI-Layers (Kontroll-Lauf) begrenzt proteolysiert mit α-Chymotrypsin

Bahn 3: " " " Trypsin

Bahn 4: " " " Pronase E

Bahn 5: " " " Pronase K

Bahn 6: " " " V8-Proteinase

Bahn 7: " " " Subtilisin

Bahn 8: " " " Thermolysin

Bahn 9: " " " Papain

(Trenngellänge 14 cm)

Abb. C: Bahn 1,2,6: Elektropherogramme des HPI-Layers R_1 (mit PMSF in SDS bei 60°C präpariert)

Bahn 7: Elektropherogramme des HPI-Layers R_1 (ohne PMSF in SDS bei 60°C präpariert)

Bahn 4: Elektropherogramm des HPI-Layers Sark (begrenzt proteolysiert mit (PEp P-)Proteinase aus R_1

Bahn 5: Elektropherogramm des HPI-Layers R_1 (begrenzt proteolysiert mit (PEp P-) Proteinase aus R_1

Abb. D: Bahn 1: siehe Abb. C, Bahn 1, 2, 6

Bahn 2: siehe Abb. C, Bahn 5

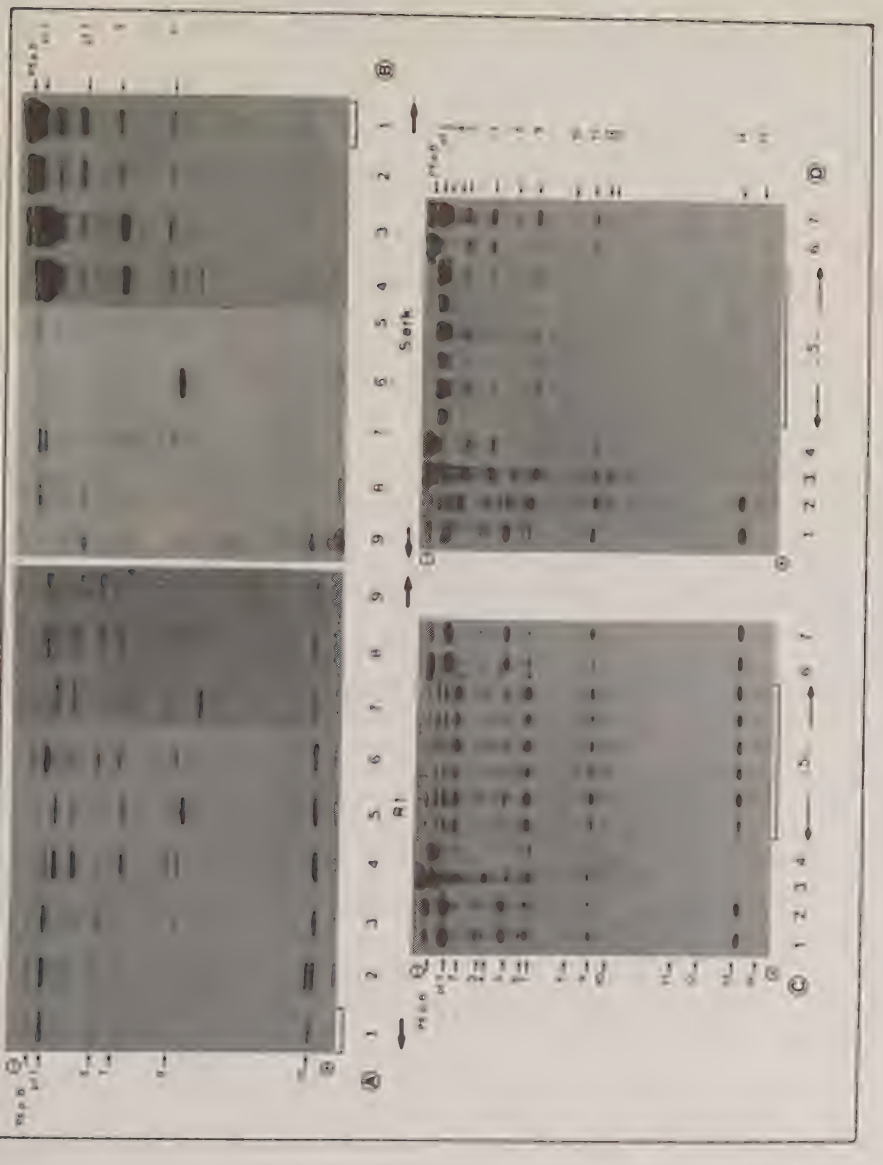
Bahn 3, 7: Elektropherogramm des HPI-Layers Sark (ohne PMSF in SDS bei 60°C präpariert)

Bahn 4, 6: Elektropherogramm des HPI-Layers Sark (mit PMSF in SDS bei 60°C präpariert)

Bahn 5: Elektropherogramm des HPI-Layers Sark (begrenzt proteolysiert mit (PEp P-) Proteinase aus R_1

Die schwarzen Punkte deuten auf die stärksten Veränderungen im Bandenmuster.

SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt. Gelgradient 10 - 16 % Acrylamid. Trenngellänge 30 cm



Tafel 30 Temperaturabhängige Dissoziationsreihe der Pink Envelope (PE) mit SDS (2 % w/v) aus *Deinococcus Radiodurans* Sark

Abb. A: Bahn 1 (Kontrolle): Elektropherogramm einer PE (mit Lysozym kontaminiert)

Bahn 2 bis 8: Elektropherogramme der jeweiligen Überstände einer PE (Lysozym kontaminiert), gewonnen nach Solubilisierung mit SDS (2 % w/v) bei unterschiedlichen Solubilisierungstemperaturen (Dissoziationstemperatur = die jeweilige Solubilisierungstemperatur, s.Abb.A.Werte in °C).

Bahn 9 bis 13: Elektropherogramme der jeweiligen HPI-Layer-Pellets, gewonnen nach einer PE-Solubilisierung mit SDS (2 % w/v) mit unterschiedlichen Solubilisierungstemperaturen (Dissoziationstemperatur: 100°C).

Abb. B: Bahn 1 und 14 (Kontrolle): siehe Abb. A, Bahn 1

Bahn 2, 4, 6, 8,10,12: Elektropherogramme der jeweiligen Überstände einer PE (Lysozym kontaminiert), gewonnen nach Solubilisierung mit SDS (2 % w/v) bei unterschiedlichen Solubilisierungstemperaturen (Dissoziationstemperatur = die jeweilige Solubilisierungstemperatur, siehe Abb.B. Werte in °C).

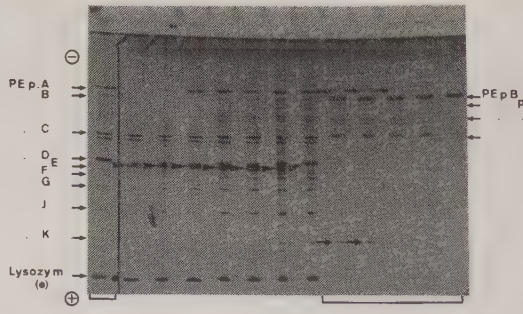
Bahn 3, 5, 7, 9,11,13: Elektropherogramme der jeweiligen Überstände aus Bahn 2, 4, 6, 8, 10, 12. Diese Überstände wurden jeweils nach der Solubilisierung dissoziiert bei 100°C in Anwesenheit von SDS.

Abb. C: Die Tabelle faßt die Ergebnisse der Abb. A, Bahn 2 bis 8 zusammen. Das Auftreten einer Bande eines Polypeptids in der SDS-PAGE wird durch + oder +/- (schwach) und das Nichtauftreten mit - Zeichen kenntlich gemacht.

(hm = hitzemodifizierbares Polypeptid, siehe Pfeilkopf)

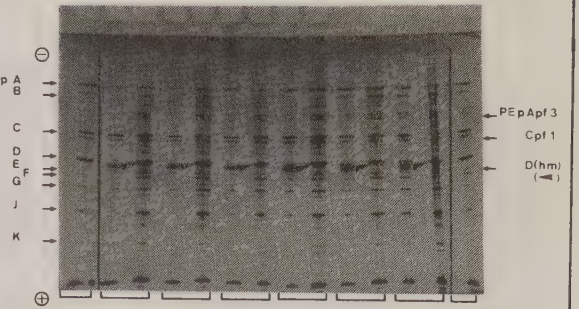
SDS-PAGE mit Silber gefärbt. Gelgradient 10 - 16 % Acrylamid. Trenngellänge 14 cm.

NB: Die Pink Envelope-Proteine wurden mit dem Detergens SDS unter den Bedingungen wie in 2.7.1.2.3 beschrieben behandelt. Das Solubilisat (Überstand) wurde durch Zentrifugation vom Sediment (HPI-Layer) abgetrennt.



A 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

(20 30 40 50 60 80 100/20 30 40 50 60) (°C)



B 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

(20→100 / 30→" / 40→" / 50→" / 60→" / 80→100) (°C)

C

PEp-Protein	Solubilisierungstemperatur (°C)						
	25	30	40	50	60	80	100
PEp A	−	−	+	+	+	+	+
" B	−	−	−	−	−/+	+	+
Apf3	−	−	−	−/+	−/+	+	+
" C	+	+	+	+	+	+	+
Cpf1	+	+	+	+	+	+	+
" D	−/+	−/+	−/+	+	+	++	++
D(hm)	++	++	++	++	++	+	−
" E	−/+	+	+	+	+	+	+
" F	−/+	+	+	+	+	+	+
" G	+	+	+	+	+	+	+
" H	−/+	−/+	−/+	−/+	+	+	+
" I	−/+	−/+	−/+	−/+	+	+	+
" J	−/+	+	+	+	+	+	+
" K	−/+	+	+	+	+	+	+

T30

Tafel 31 Solubilisierungsversuch mit SDS (2 % w/v) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Solublisierungstemperaturen an Zellwänden (Zw) von *Deinococcus radiodurans* Sark

Abb. A: Bahn 1 und 14 (Kontrolle): Elektropherogramme von Zw

Bahn 2, 5, 8, 11: Elektropherogramme der Überstände, erhalten nach einer Solubilisierung mit SDS der Zw mit folgenden Solubilisierungstemperaturen: 30, 40, 60, 80°C. Dissoziationstemperatur = 100°C

Bahn 3, 6, 9, 12: Elektropherogramme der HPI-Layer-Pellets, gewonnen nach einer Solubilisierung mit SDS der Zw mit folgenden Solubilisierungstemperaturen: 30, 40, 60, 80°C, und Verdauung des Mureins mit Lysozym bei 30°C. Dissoziationstemperatur = 100°C

Bahn 4, 7, 10,13: Elektropherogramme der Lysozymhydrolysate des Mureins aus der Zw nach vorheriger SDS Solubilisierung dieser bei folgenden Solubilisierungstemperaturen: 30, 40, 60, 80°C und vorheriger Gewinnung und Entfernung des HPI-Layers. Dissoziationstemperatur = 100°C

Abb. B: Bahn 1 (Kontrolle): siehe Abb. A, Bahn 1

Bahn 2, 4, 6, 8: siehe Abb. A, Bahn 4, 7, 10, 13
Nur hier Dissoziationstemperatur = Solubisierungstemperatur jeweils also 30, 40, 60, 80°C

Bahn 3, 5, 7, 9: idem:Abb. A, Bahn 4, 7, 10, 13

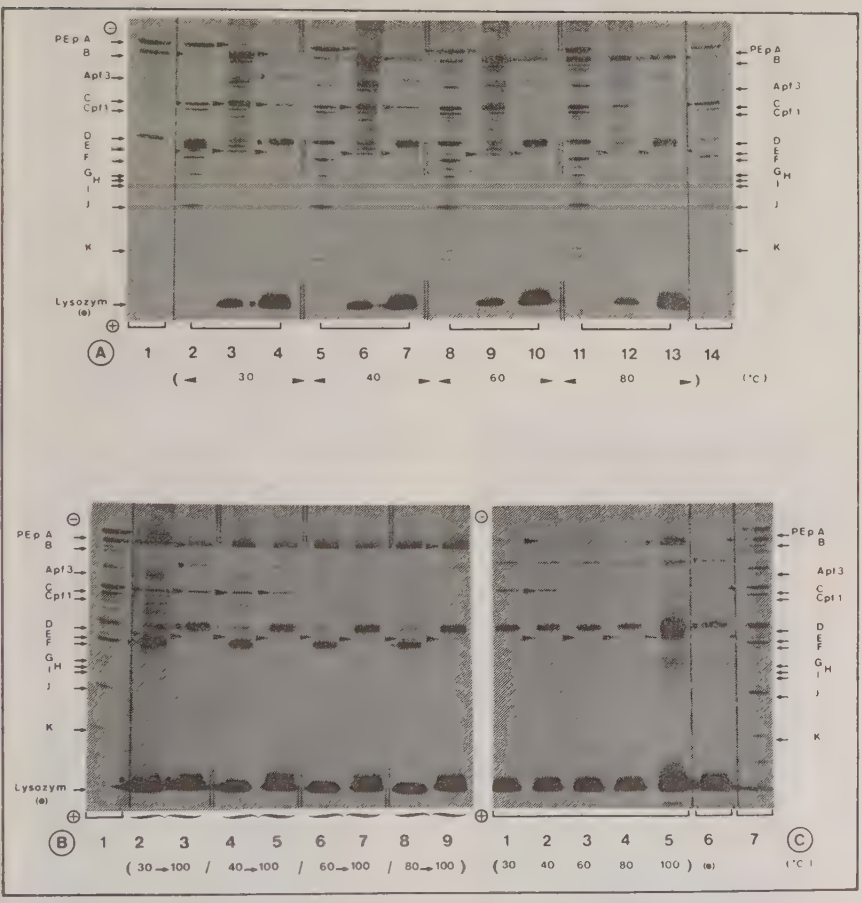
Abb. C: Bahn 7 (Kontrolle): siehe Abb. A, Bahn 1

Bahn 1, 2, 3, 4: idem: Abb. A, Bahn 4, 7, 10, 13

Bahn 5: idem: Abb. A, Bahn 4, 7, 10, 13 außer der Solubilisierungstemperatur, die hier 100°C betrug. Gel wurde überladen zur Darstellung von PEp E

Bahn 6 (Kontrolle): Elektropherogramm aus Lysozym,mit dem die Verdauung des Mureins durchgeführt wurde. Die schwarzen Punkte kennzeichnen die Banden der Probe.

SDS-PAGE mit Silber gefärbt, Gelgradient 10 - 16 % Acrylamid. Trenngellänge 14 cm.


PEp A
B
Apt 3
C
Cpt 1
D
E
F
G
H
I
J
K
Lysozym
(e)
A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
(30 40 60 80) (°C)
B
1 2 3 4 5 6 7 8 9
(30→100 / 40→100 / 60→100 / 80→100)
C
1 2 3 4 5 6 7
(30 40 60 80 100) (e)
(°C)

Tafel 32 Darstellung der Murein-Sacculi und HPI-Layer nach einem SDS-Solubilisierungsversuch mit SDS (2 % w/v) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Solubilisierungstemperaturen an Zellwänden (Zw) von *Deinococcus radiodurans* Sark

Abb. A bis E: Murein-Sacculi,gewonnen aus Zw nach SDS-Solubilisierung mit folgenden Solubilisierungstemperaturen: 30, 40, 60, 100°C.

Suspensionspräparate mit Phosphorwolframsäure negativkontrastiert.

Die Sacculi sind z.T. mit HPI-Layer-Fladen bedeckt (siehe Pfeilköpfchen in den jeweiligen Kreisen).

Abb. F bis H: HPI-Layer-Fladen, gewonnen aus Zw nach SDS. Solubilisierung mit folgenden Solubilisierungstemperaturen: 30, 40, 60°C.

Suspensionspräparate mit Phosphorwolframsäure negativkontrastiert.

Die Pfeilköpfchen weisen auf Kontamination durch Mureinreste und Proteine (siehe Abb. I).

Abb. I:

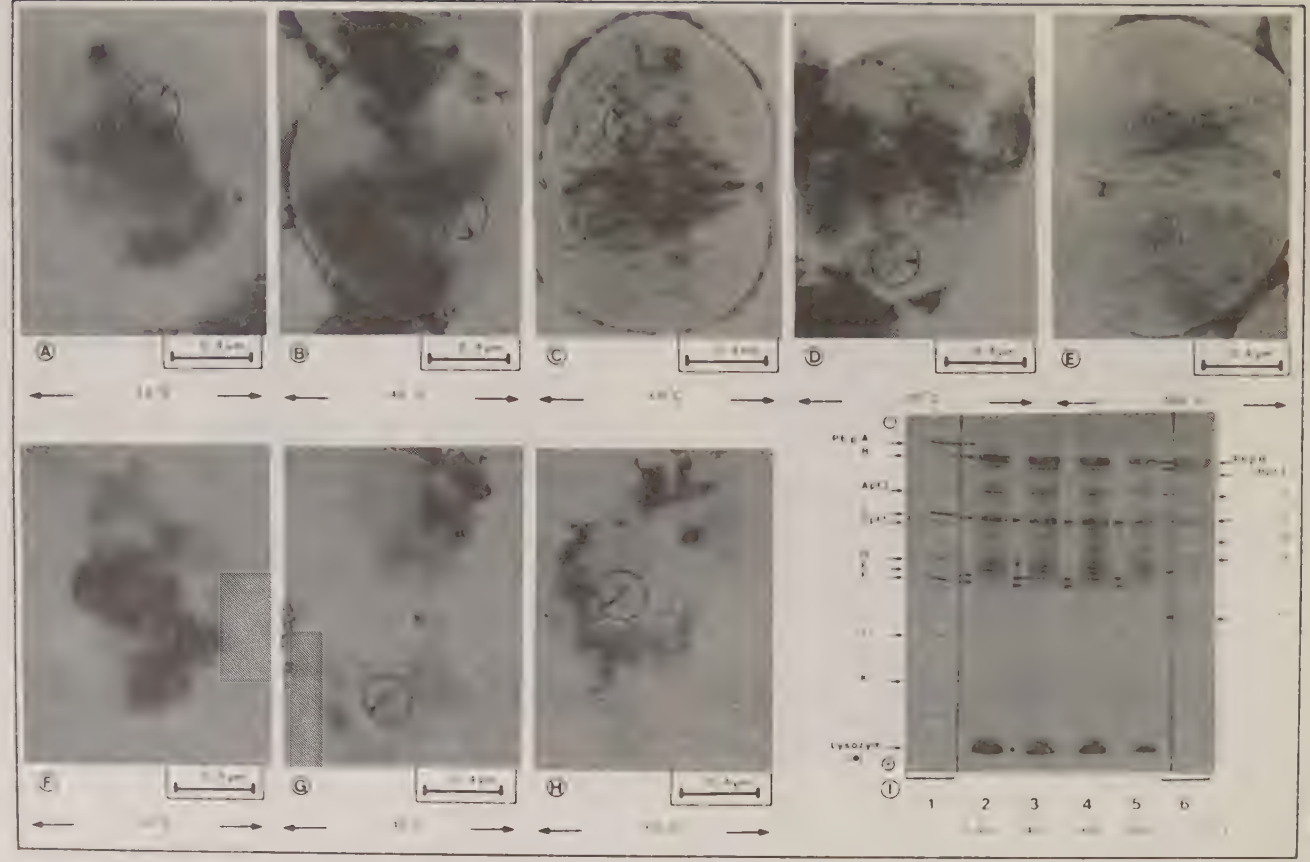
Bahn 1 (Kontrolle): Elektropherogramm von Zw

Bahn 6 (Kontrolle): Elektropherogramm vom HPI-Layer-Protein (mit PMSF als Inhibitor, bei 60°C mit SDS aus ganzen Zellen gewonnen).

Bahn 2, 3, 4, 5: Elektropherogramme des HPI-Layer-Pellets, gewonnen nach einer Solubilisierung mit SDS der Zw mit 30, 40, 60, 80°C als Solubilisierungstemperatur jeweils und nach Verdauung des Mureins mit Lysozym bei 30°C. Dissoziationstemperatur = 100°C.

Die schwarzen Punkte zeigen die Bandenkontamination aus Lysozym und die Pfeile links im Bild zeigen die Kontamination durch PEp-Proteine, die rechts im Bild weisen auf die eigenen Banden des HPI-Layer-Proteins hin.

SDS-PAGE mit Silber gefärbt. Gelgradient 10 - 16 % Acrylamid. Trenngellänge 14 cm.


A
B
C
D
E
F
G
H
1
2
3
4
5
6

Tafel 33 Vernetzungsversuche an der Pink Envelope (PE) und Zellwand (Zw) von *Deinococcus radiodurans* Sark mit dem reversiblen Vernetzer DTSP

(Eindimensionale Vernetzungskarte)

Abb. A: Bahn 1 (Kontrolle): Elektropherogramm aus PE.

Bahn 2 bis 6: Elektropherogramme des Vernetzungsmusters der PE in Abhängigkeit von zunehmenden DTSP Konzentrationen (0.08 bis 6.25 mM DTSP).

Die Pfeilköpfchen weisen auf Vernetzungsprodukte hin (siehe auch Abb. B, C).

SDS-PAGE mit Silber gefärbt. Gradientengel 10 - 16 % Acrylamid. Trenngellänge 14 cm.

Abb. B: Bahn 1 bis 2: Elektropherogramme der Zw (ohne Tritonbehandlung) nach Vernetzung mit DTSP (0,69 mM).

Bahn 3 bis 5: Elektropherogramme der PE nach Vernetzung mit DTSP (2.08 mM)

SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt. Gradientengel 7.5 - 12 % Acrylamid. Trenngellänge 14 cm.

Abb. C: Bahn 1 (Kontrolle): Elektropherogramm aus Zw.

Bahn 6 (Marker-Proteine): Myosin (200 kD), ß-Galactosidase (116 kD), Phosphosylase B (92 kD), BSA (66 kD), Ovalbumin (45 kD).

Bahn 2: Elektropherogramm der Zw (ohne Tritonbehandlung) nach Vernetzung mit DTSP (0.69 mM).

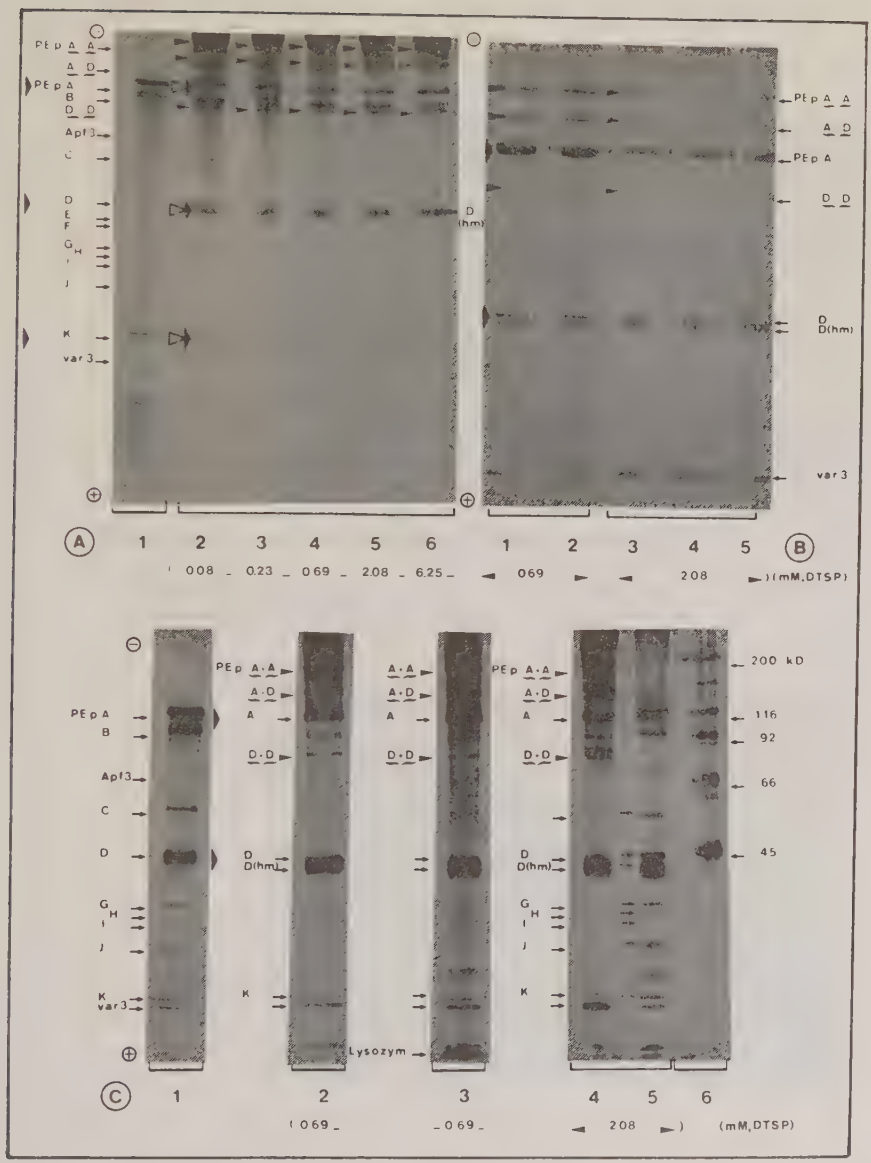
Bahn 3: Elektropherogramm der PE (gewonnen aus Zw ohne Tritonbehandlung) nach Vernetzung mit DTSP (0.69 mM).

Bahn 4: Elektropherogramm der PE (gewonnen aus Zw mit Tritonbehandlung) nach Vernetzung mit DTSP (2.08 mM).
(Lysozym kontaminiert).

Bahn 5: idem Bahn 4. Hier wurde die Vernetzung mit DTT rückgängig gemacht. Dissoziationstemperatur = 100°C.
Die Pfeile deuten auf die vorher vernetzten Polypeptide.

SDS-PAGE mit Silber gefärbt. Gradientengel 7.5 - 12 % Acrylamid. Trenngellänge 14 cm.

NB: Alle Proben sind Solubilisate, gewonnen nach SDS-Extraktionen (T = 60°C) von PE und Zw nach Vernetzung mit DTSP und Abtrennung des HPI-Layers (Dissoziationstemperatur = 60°C für diese Proben). (hm = hitzemodifizierbares Polypeptid , siehe auch Tafel 30 und Kap. 3.2.1).


PEp A A
A D
PEp A
B
D D
Apf3
C
D
E
F
G
H
I
J
K
var3
D
(hm)
PEp A A
A D
PEp A
D D
D
D(hm)
var3
A
1
2
3
4
5
6
0.08 - 0.23 - 0.69 - 2.08 - 6.25
0.69
2.08
(mM,DTSP)
B
1
2
3
4
5
PEp A·A
A·D
A
D·D
D
D(hm)
Apf3
C
K
var3
Lysozym
200 kD
116
92
66
45
C
1
2
3
4
5
6
0.69
0.69
2.08
(mM,DTSP)

Tafel 34 Vernetzungsversuche von der Pink Envelope (PE) von *Deinococcus radiodurans* Sark und Sark (HPI^-) mit dem reversiblen Vernetzer DTSP

(Zweidimensionale Vernetzungskarte)

Abb. A: Bahn 1 (Kontrolle): Elektropherogramm aus PE.

Bahn 2: Elektropherogramm der PE (Stamm Sark) nach Vernetzung mit DTSO (2.08 mM).

Bahn 3: Elektropherogramm der zweidimensionalen Vernetzungskarte des Solubilisats, gewonnen nach einer SDS-Extraktion (T = 60°C) der PE (Stamm Sark) nach Vernetzung mit DTSP (2.08 mM) und Abtrennung des HPI-Layers.

SDS-PAGE mit Silber gefärbt. Gradientengel 7.5 - 12 % Acrylamid. Trenngellänge 14 cm.

(Die erste Dimension (*1 Dim*) der Vernetzungskarte wurde mit Coomassie gefärbt.)

Abb. B: Bahn 1: Elektropherogramm der PE (Stamm Sark (HPI^-)) nach Vernetzung mit DTSP (0.69 mM).

Bahn 2: Elektropherogramm der zweidimensionalen Vernetzungskarte des Solubilisats, gewonnen nach einer SDS-Extraktion T = 60°C der PE (Stamm Sark (HPI^-)) nach Vernetzung mit DTSP (0.69 mM).

SDS-PAGE mit Silber gefärbt. Gradientengel 7.5 - 12 % Acrylamid. Trenngellänge 14 cm.

(Die erste Dimension (*1 Dim*) der Vernetzungskarte wurde mit Coomassie gefärbt.)

Die dicken Pfeile in der 1. Dimension weisen auf vernetzte Aggregate hin, die nicht in die Gelmatrix hineindringen können.

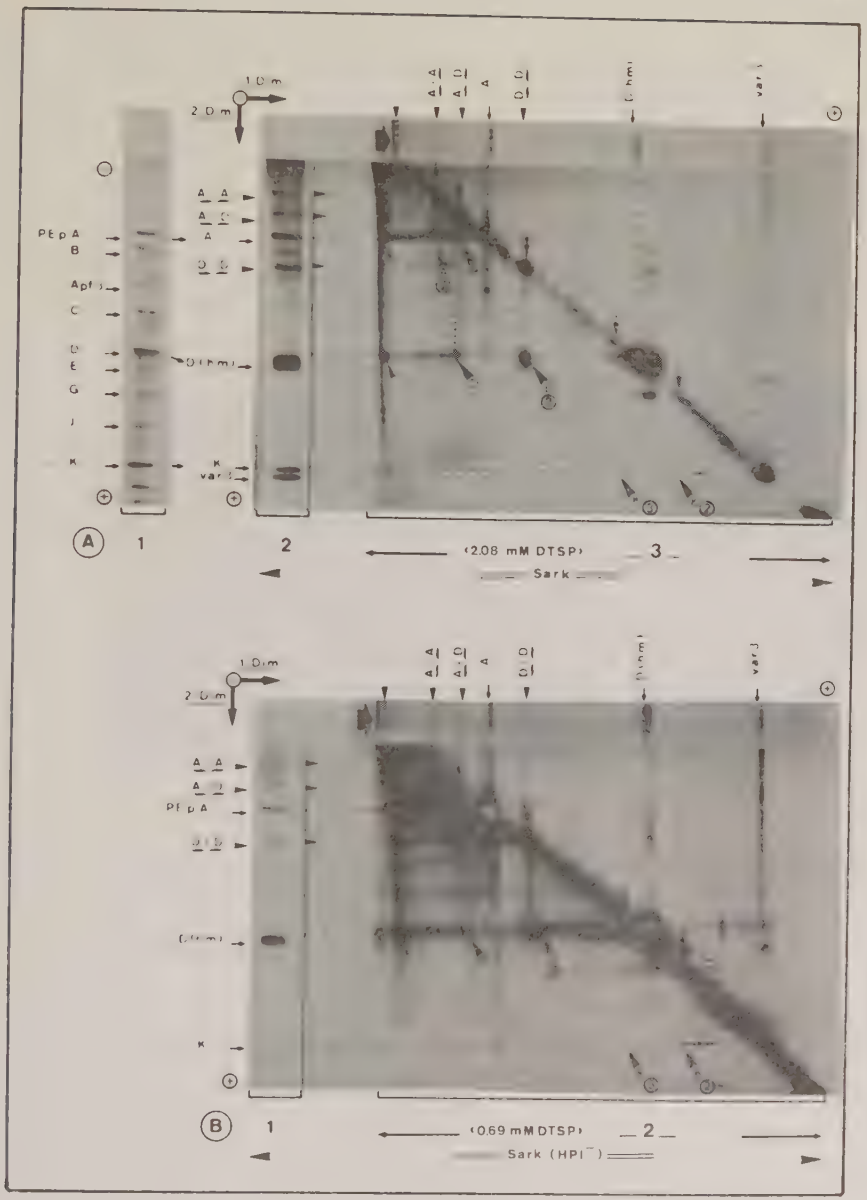
Die kleinen Pfeilköpfe weisen auf die Vernetzungsprodukte in der eindimensionalen Vernetzungskarte (siehe auch Tafel 33) hin.

Die großen Pfeilköpfe weisen auf die identifizierten Polypeptidflecken hin, die aus Vernetzungsprodukten in der ersten Dimension stammen (siehe Abb. 6 in Kap. 3.2.3.1.2).

Die dünnen punktierten Linien deuten auf vertikale und horizontale Beziehungen als Orientierungshilfe hin. Die starke und kurze punktierte vertikale Linie deutet auf die vertikale Beziehung zwischen PEp A und PEp D hin (siehe auch Kap. 2.9.2.3: Prinzip der zweidimensionalen Kartierung von Vernetzungsprodukten (Abb. 4)).

(2) = Dimer

(3) = Trimer


1 D m
2 D m
PEpA
B
Apf-1
C
E
G
J
K
A
1
2
(2.08 mM DTSP)
3
Sark
(0.69 mM DTSP)
2
Sark (HPI⁻)

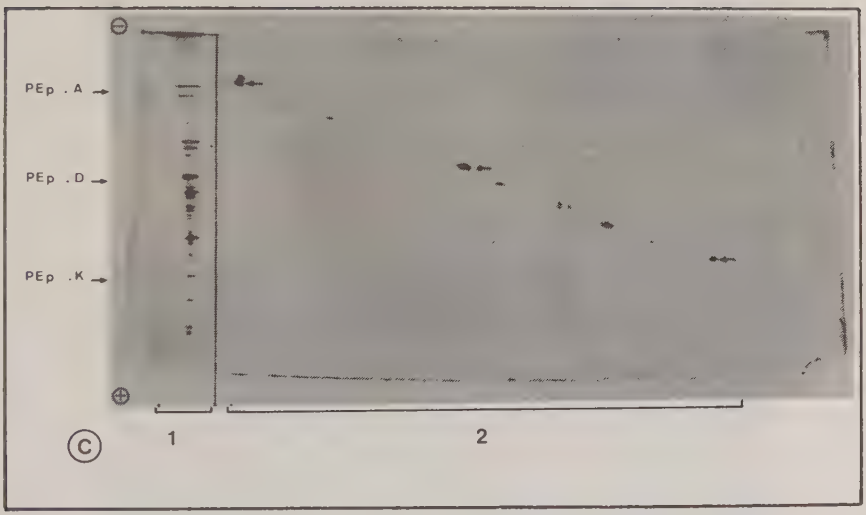
Tafel 34

Abb. C: (Kontrolle):

Bahn 1: Elektropherogramm der Pink Envelope

Bahn 2: Elektropherogramm der Pink Envelope in der zweiten Dimension (ohne Vernetzung). Unterhalb der Diagonale sind keine Polypeptidflecken vorhanden.

SDS-PAGE mit Silber gefärbt. Gelgradient 10 - 16 % Acrylamid


PEp . A
PEp . D
PEp . K
1
2
C

Tafel 35 Vernetzungsversuche an der Pink Envelope (PE) von *Deinococcus radiodurans* Sark mit dem reversiblen Vernetzer DTSP

(eindimensionale Vernetzungskarte)

Abb. A: Bahn 1 (Kontrolle): Elektropherogramm aus Zw

Bahn 7: Elektropherogramm aus HPI-Layer,isoliert mit SDS bei 60°C aus der Pink Envelope.

Bahn 2 bis 6: Elektropherogramme der Vernetzungsmuster der HPI-Layer, gewonnen nach SDS-Extraktion (T = 60°C) aus PE nach Vernetzung mit DTSP. (Die Vernetzung wurde in Abhängigkeit der Vernetzerkonzentration durchgeführt (0.08 mM bis 6.25 mM)).

Die kleinen Pfeilköpfe deuten auf vernetzte PEp-Proteine an dem HPI-Layer.

Die Pfeile rechts im Bild deuten auf die Banden des HPI-Layers (Abb. A, B und Abb. C links im Bild).

SDS-PAGE mit Silber gefärbt. Gradientengel 10 - 16 % Acrylamid.Trenngellänge 14 cm.

Abb. B: Bahn 4 (Kontrolle): idem Abb. A, Bahn 7

Bahn 1 bis 3: idem Abb. A, Bahn 4 bis 6

SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt. Gradientengel 7.5 - 12 % Acrylamid. Trenngellänge 14 cm.

Abb. C: Bahn 1 (Kontrolle): idem Abb. A, Bahn 7

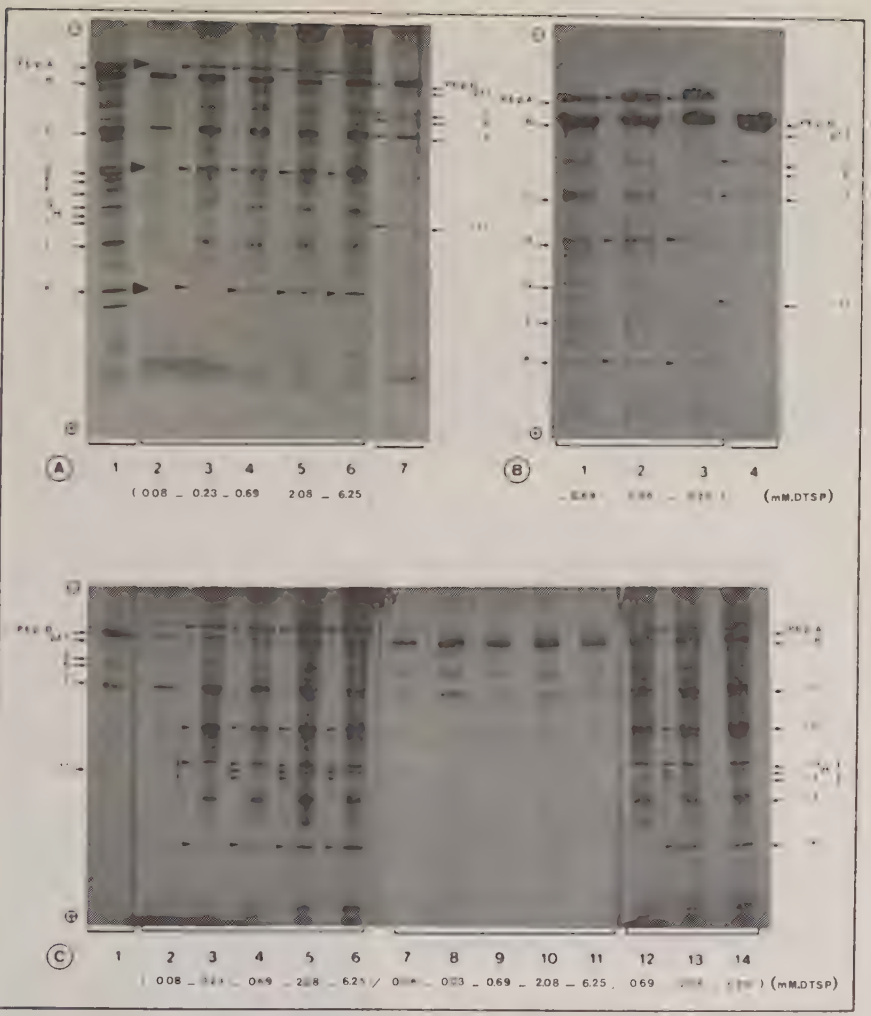
Bahn 2 bis 6: Elektropherogramme der PEp-Proteine (die vorher an den HPI-Layern vernetzt waren (siehe Abb. A, Bahn 2 bis 6)), gewonnen aus den Layern, nachdem die Vernetzung durch DTT-Zugabe rückgängig gemacht wurde. Die Vernetzungsmuster zeigen Resultate in Abhängigkeit der Vernetzerkonzentration (0.08 bis 6.25 mM DTSP).

Bahn 7 bis 11: Elektropherogramme der HPI-Layer, gewonnen nach einer Vernetzung der PE und Entfernung durch DTT-Behandlung der mit dem Layer vernetzten PEp-Proteine (siehe Bahn 2 bis 6 in Abb. C).

Bahn 12 bis 14: idem Abb. A, Bahn 4, 5, 6

Die mit schwarz umrandeten kleinen Pfeile 1 und 2 deuten darauf hin, daß diese aufgetrennten PEp-Proteine (Pfeil 2) und HPI-Layer (Pfeil 1) vor der rückgängig gemachten Vernetzung in den Proben (Pfeil 1,2) zusammen beinhaltet waren.

SDS-PAGE mit Silber gefärbt.Gradientengel 10 - 16 % Acrylamid, Trenngellänge 14 cm.


A
1 2 3 4 5 6 7
(0.08 _ 0.23 _ 0.69 2.08 _ 6.25
B
1 2 3 4
(mM.DTSP)
C
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
0.08 _ 0.69 _ 2.08 _ 6.25 / 0.69 (mM.DTSP)

Tafel 36 Elektronenmikroskopische Darstellung der PEp-Proteine, vernetzt mit dem HPI-Layer durch den Vernetzter DTSP

Abb. A: HPI-Layer aus Stamm Sark, einseitig bedampft mit Ta/W nach Lufttrocknung (S) smooth surface = Außenseite des Layers; (R) rough surface = Innenseite des Layers. Diese Fläche ist zu der Außenfläche der äußeren Membran gerichtet.
Bedampfungswinkel 45°

ABB. B, C, D: HPI-Layer, vernetzt mit PEp-Proteinen. Der Layer wurde nach einer SDS-Extraktion (T = 60°C) aus PE nach Vernetzung mit DTSP (2.08 mM) isoliert. Der Layer wurde nach Gefriertrocknung einseitig bedampft mit PT/C.
Bedampfungswinkel 45°

Abb. B zeigt die Außenfläche des Layers (S), frei von PEp-Proteinen.

Abb. C zeigt die Innenfläche des Layers (R), zum großen Teil belegt mit PEp-Proteinen (vor allem PEp A, D, G, H, I und K, siehe Abb. E).
Der Insert zeigt eine starke Vergrößerung aus dem schwarz umrandeten Kreis.

Abb. D zeigt einen HPI-Layer-Fladen, der gleichzeitig die beiden Seiten des Layers darstellt. Die PEp-Proteine sind ausschließlich auf der Innenseite des Layers (R) mit DTSP vernetzt worden.

Abb. E: Bahn 3: Elektropherogramm des HPI-Layers idem Abb. A, Bahn 7 (siehe Tafel 35)

Bahn 1, 2: Elektropherogramm des HPI-Layers, vernetzt mit PEp-Proteinen, idem Abb. C, Bahn 5, 6 (siehe Tafel 35)

SDS-PAGE mit Silber gefärbt. Geldgradienten 10 - 16 % Acrylamid, Trenngellänge 14 cm

Abb. F: Bahn 1: idem Abb. A, Bahn 7 (siehe Tafel 35)

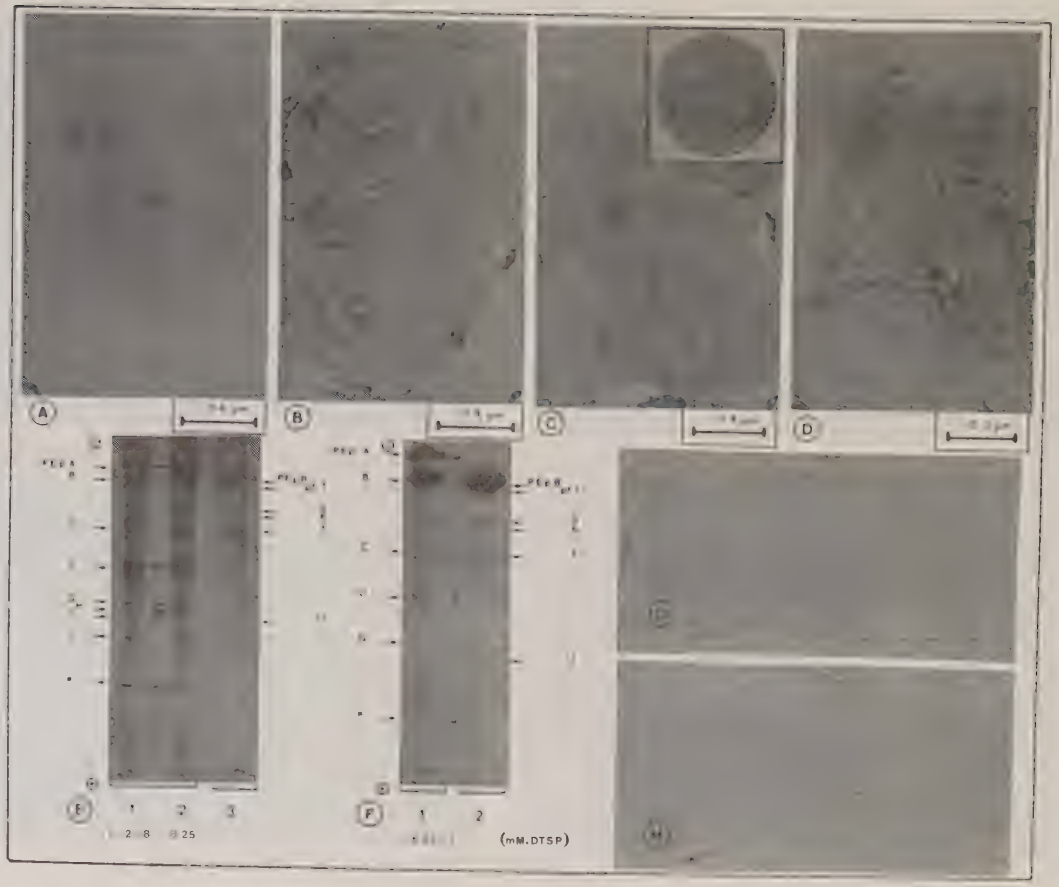
Bahn 2: idem Abb. C, Bahn 6 (siehe Tafel 35)

SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt, Gelgradienten 7.5 - 12 % Acrylamid, Trenngellänge 14 cm

Abb. G: Infrarot-Spektrum des HPI-Layer-Proteins (gewonnen aus PE nach einer SDS-Extraktion (T = 60°C) (siehe Abb. A)

Abb. H: Infrarot-Spektrum des HPI-Layer Proteins, vernetzt mit PEp-Proteinen (gewonnen nach einer SDS-Extraktion (T = 60°C) aus PE nach Vernetzung mit DTSP (2.08 mM); siehe Abb B bis D)).

Abkürzung: PE = Pink Envelope


A
B
C
D
E
1
2
3
F
1
2
(mM.DTSP)
G
H

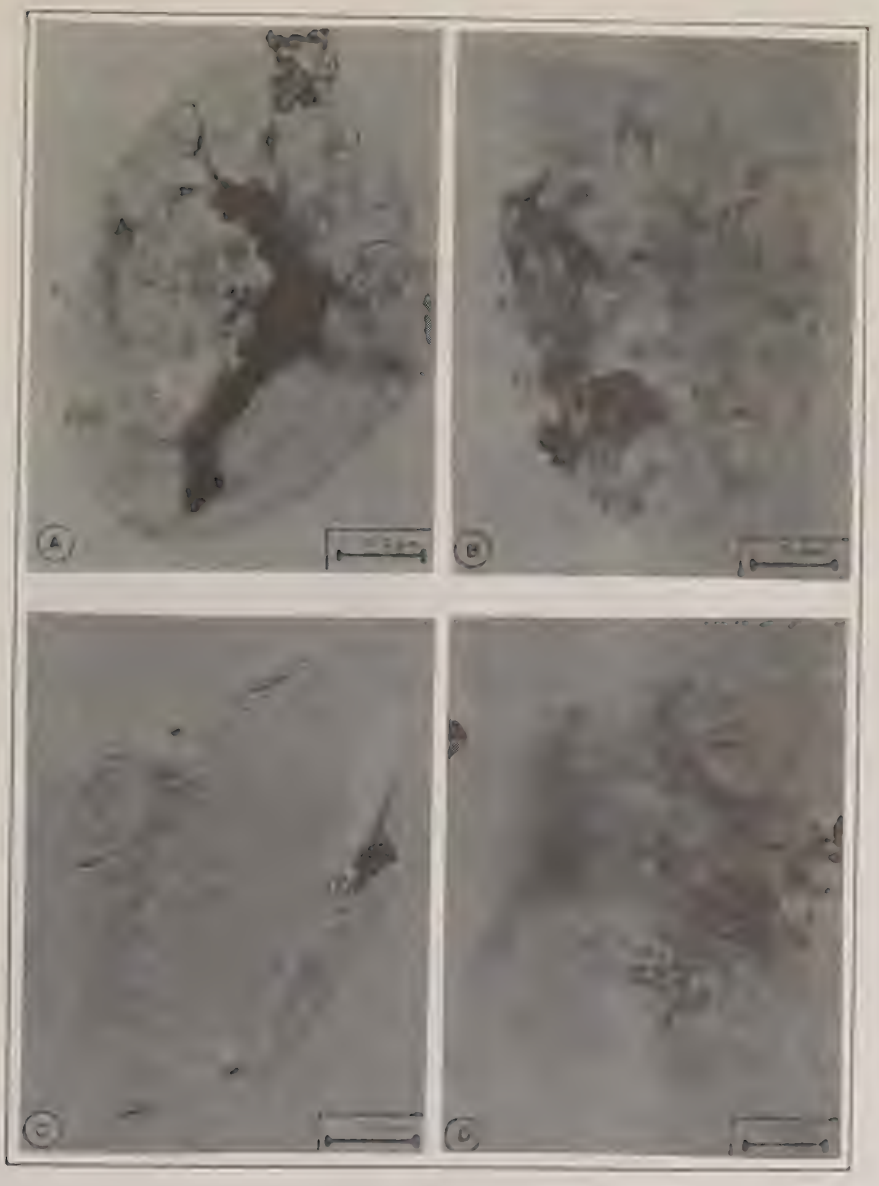
Tafel 37 Pink Envelopes nach Gefriertrocknung und Metallbedampfung

Alle Pink Envelopes wurden nach Gefriertrocknung einseitig mit Pt/C bedampft.
Bedampfungswinkel 45°

Abb. A: Pink Envelope aus *Deinococcus radiodurans* , R_1
Die glatte Seite ("smooth surface") (S) und damit die Außenseite des HPI-Layers ist gut sichtbar. Die innere Pore und die Rosetten sind gut dargestellt. Die HPI-Layer-Außenfläche ist nicht mit zusätzlichen Proteinen bedeckt. Die amorph erscheinende Außenfläche der äußeren Membran ist gut sichtbar.

Abb. B, C: Pink Envelope aus *Deinococcus radiodurans*, Sark
Die gleiche Bildbeschreibung wie die des Stammes R_1 gilt hier (siehe Abb. A). Die freie Außenfläche der äußeren Membran ist hier eindeutig kleiner (Abb. B links am Rand der Envelope) als bei R_1.

Abb. D: Pink Envelope aus *Deinococcus radiodurans*, Sark (HPI^-)
Der HPI-Layer ist abwesend bei dieser Mutante von Sark. Die Außenfläche der äußeren Membran ist gut dargestellt. Sie erscheint amorph und zeigt vor allem keine kristalline Struktur. Einige Faltungen der Oberfläche sind sichtbar. Die Konturen der Envelope sind klar gezeichnet und erinnern sehr an die bakterielle Form, dies zeugt offenbar für eine hohe Rigidität der äußeren Membran.


A
B
C
D

Tafel 38 Detergensextraktionen an ganzen Bakterien und an der Pink Envelope von *Deinococcus radiodurans* Sark mit dem Detergens MEGA-10 (Solubilisierungstemperatur 30°C)

Abb. A: (Leerwert). Ultradünnschnitt einer ganzen Bakterienzelle Die Pfeile deuten auf die unterschiedlichen Schichten der Zellwand (siehe Tafel 1 und 8 sowie Kap. 3.1.1).

Abb. B: Ultradünnschnitt einer ganzen Bakterienzelle nach der Detergensbehandlung. Die Pfeilköpfe deuten auf morphologische Veränderungen in der Zellwand (siehe 3.2.4.1).
Fixierung: OsO_4/Rutheniumrot
Nachkontrastierung: Uranylacetat/Bleicitrat

Abb. C: Pink Envelope nach einer dreifachen Detergensextraktion (mit 100 mM NaCl) einseitig mit Pt/C bedampft. Bedampfungswinkel 45°. Die glatte Außenseite des HPI-Layers ist gut zu erkennen, unterhalb des Layers sind Aggregate angedeutet, die Unebenheiten erzeugen (siehe 3.2.3.2.1 und Abb. E).

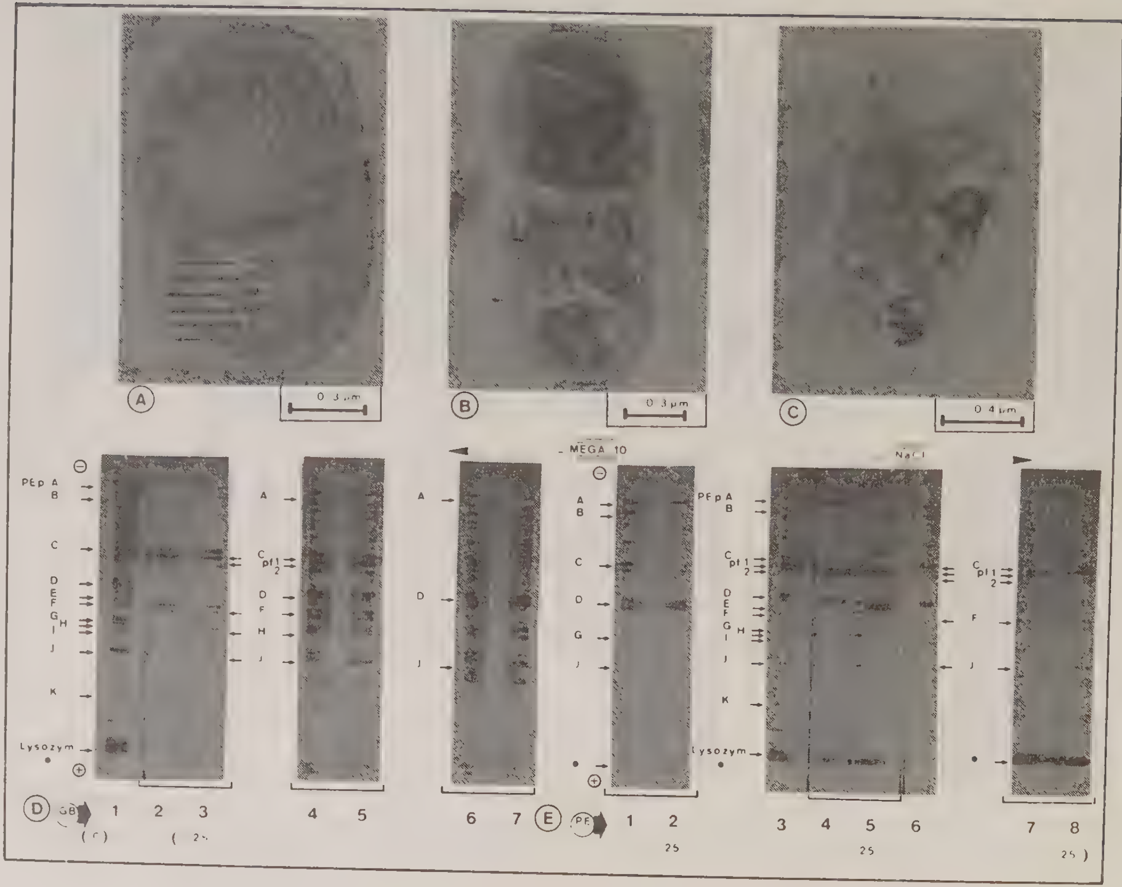
Abb. D: Elektropherogramme von Detergenssolubilisaten aus Detergensextraktionen an GB:
Bahn 1 (Kontrolle): Elektropherogramm aus PE (+ Lysozym)
Bahn 2-3: Detergens (+ 15 mM $CuCl_2$). Bahn 3: Dissoziationstemperatur 25°C
Bahn 4-5: Detergens (+ 100 mM NaCl)
Bahn 6-7: Detergens (ohne Begleitionen)

Abb. E: Elektropherogramme von Detergenssolubilisaten aus Detergensextraktionen an PE (+ Lysozym):
Bahn 3 (Kontrolle): Elektropherogramm aus PE (+ Lysozym)
Bahn 1-2: Detergens (ohne Begleitionen)
Bahn 4-5: Detergens (+ 100 mM NaCl)
Bahn 7-8: Detergens (+ 15 mM $CuCl_2$)
Bahn 6: Pellet gewonnen nach einer dreifachen Detergensextraktion an PE (+ 100 mM NaCl) (siehe Abb. C)

Die kleinen Pfeile deuten auf die extrahierten und identifizierten PEp-Polypeptide in der SDS-PAGE.
Die schwarzen Punkte deuten auf Lysozym.
SDS-PAGE mit Silber gefärbt. Gelgradienten 10 - 16 % Acrylamid. Trenngellänge 14 cm

Abkürzungen: GB = ganze Bakterien
PE = Pink Envelope

NB: Die Temperaturangaben (in °C) bei den Elektropherogrammen geben Hinweise über die Dissoziationstemperatur der Proben in Anwesenheit von SDS. Alle übrigen Proben wurden mit SDS bei 100°C dissoziiert (siehe 2.7.1.2.4).


A
0.3 µm
B
0.3 µm
C
0.4 µm
MEGA 10
NaCl
PEp A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
Lysozym
Cpf1
2
D
GB
1
2
3
4
5
6
7
E
PE
1
2
25
3
4
5
6
7
8
25
25)

Tafel 39 Detergensextraktionen an ganzen Bakterien und an der Pink Envelope von *Deinococcus radiodurans* Sark und Kondensationsexperimente mit dem Detergens Triton X-114 (Solubilsierungstemperatur ca. 0°C)

Abb. A (Leerwert): Ultradünnschnitt einer ganzen Bakterienzelle. Die Pfeile deuten auf die unterschiedlichen Schichten der Zellwand (siehe Tafel 1 und 8 sowie Kap. 3.1.1).

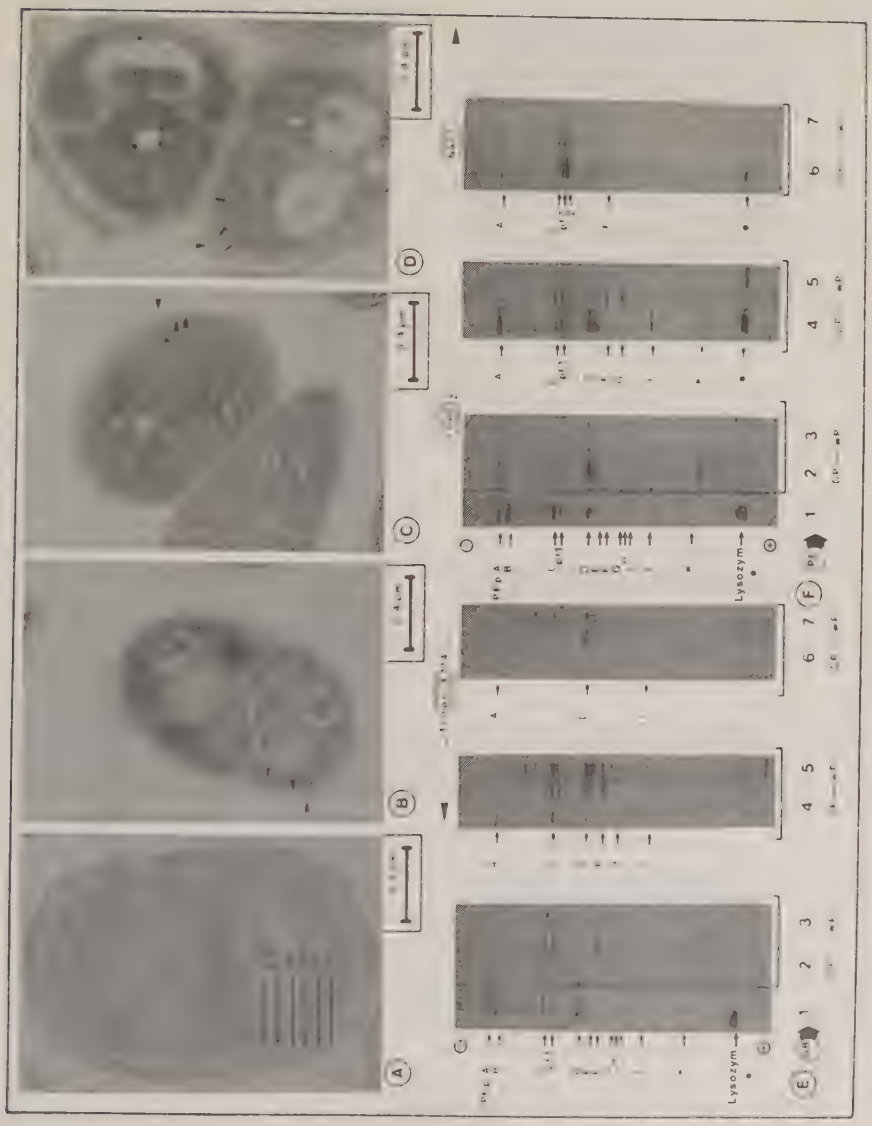
Abb. B,C,D: Ultradünnschnitte von ganzen Bakterienzellen nach Detergensbehandlungen. Die Pfeilköpfe deuten auf morphologische Veränderungen in der Zellwand (siehe 3.2.4.2).
Fixierung: OsO_4/Rutheniumrot
Nachkontrastierung: Uranylacetat/Bleicitrat
Abb. B: Detergens (ohne Begleitionen)
Abb. C: Detergens (+ 15 mM $CuCl_2$)
Abb. D: Detergens (+ 100 mM NaCl)

Abb. E: Elektropherogramme von Detergenssolubilisaten aus Detergensextraktionen an GB:
Bahn 1 (Kontrolle): Elektropherogramm aus PE (+ Lysozym)
Bahn 2-3:Detergens (+ 15 mM $CuCl_2$)
Bahn 4-5:Detergens (+ 100 mM NaCl)
Bahn 6-7:Detergens (ohne Begleitionen)

Abb. F: Elektropherogramme von Detergenssolubilisaten aus Detergensextraktionen an PE (+ Lysozym)
Bahn 1 (Kontrolle): Elektropherogramm aus PE (+ Lysozym)
Bahn 2-3: Detergens (ohne Begleitionen)
Bahn 4-5: Detergens (+ 100 mM NaCl)
Bahn 6-7: Detergens (+ 15 mM $CuCl_2$)

DP = detergensreiche Phase; wP = wässerigePhase.
Die Kleinen Pfeile deuten auf die extrahierten und identifizierten PEp-Polypeptide in der SDS-PAGE.
SDS-PAGE mit Silber gefärbt. Gelgradienten 10 - 16 % Arylamid. Trenngellänge 14 cm.

Abkürzungen: GB = ganze Bakterien
PE = Pink Envelope


A
B
C
D
E
F
Lysozym
Lysozym

Tafel 40 Detergensextraktionen an ganzen Bakterien und an der Pink Envelope von *Deinococcus radiodurans* Sark mit dem Detergens LDAO (Solubilisierungstemperatur 30°C)

Abb. A (Leerwert): Ultradünnschnitt einer ganzen Bakterienzelle. Die Pfeile deuten auf die unterschiedlichen Schichten der Zellwand (siehe Tafel 1 und 8 sowie Kap. 3.1.1).

Abb. B,C,D: Ultradünnschnitte von ganzen Bakterienzellen nach Detergensbehandlungen. Die Pfeilköpfe deuten auf morphologische Veränderungen in der Zellwand (siehe 3.2.4.3).
Fixierung: OsO_4/Rutheniumrot
Nachkontrastierung: Uranylacetat/Bleicitrat
Abb. B: Detergens (ohne Begleitionen)
Abb. C: Detergens (+ 15 mM $CuCl_2$)
Abb. D: Detergens (+ 100 mM NaCl)

Abb. E: Elektropherogramme von Detergenssolubilisaten aus Detergensextraktionen an GB:
Bahn 1 (Kontrolle): Elektropherogramm aus PE (+ Lysozym)
Bahn 2-3: Detergens (+ 15 mM $CuCl_2$). Bahn 3: Dissoziationstemperatur 25°C
Bahn 4-5: Detergens (+ 100 mM NaCl) . Bahn 5: Dissoziationstemperatur 25°C
Bahn 6-7: Detergens (ohne Begleitionen). Bahn 8:Dissoziationstemperatur 25°C

Abb. F: Elektropherogramme von Detergenssolubilisaten aus Detergenzextraktionen an PE (+ Lysozym):
Bahn 3 (Kontrolle): Elektropherogramm aus PE (+ Lysozym)
Bahn 1-2: Detergens (ohne Begleitionen) Bahn 2:Dissoziationstemperatur 25°C
Bahn 4-5: Detergens (+ 100 mM NaCl). Bahn 5: Dissoziationstemperatur 25°C
Bahn 7-8: Detergens (+ 15 mM $CuCl_2$). Bahn 8: Dissoziationstemperatur 25°C
Bahn 6: Pellet,gewonnen nach einer dreifachen Detergensextraktion an PE (+ 100 mM NaCl)

Die kleinen Pfeile deuten auf die extrahierten und identifizierten PEp-Polypeptide in der SDS-PAGE.
SDS-PAGE mit Silber gefärbt. Gelgradienten 10 - 16 % Acrylamid. Trenngellänge 14 cm.

Abkürzungen: GB = ganze Bakterien
PE = Pink Envelope

Tafel 41 Detergensextraktionen an ganzen Bakterien und an der Pink Envelope von *Deinococcus radiodurans* Sark mit dem Detergens SB-12 (Solubilisierungstemperatur 30°C)

Abb. A (Leerwert): Ultradünnschnitt einer ganzen Bakterienzelle. Die Pfeile deuten auf die unterschiedlichen Schichten der Zellwand (siehe Tafel 1 und Tafel 8 sowie Kap. 3.1.1).

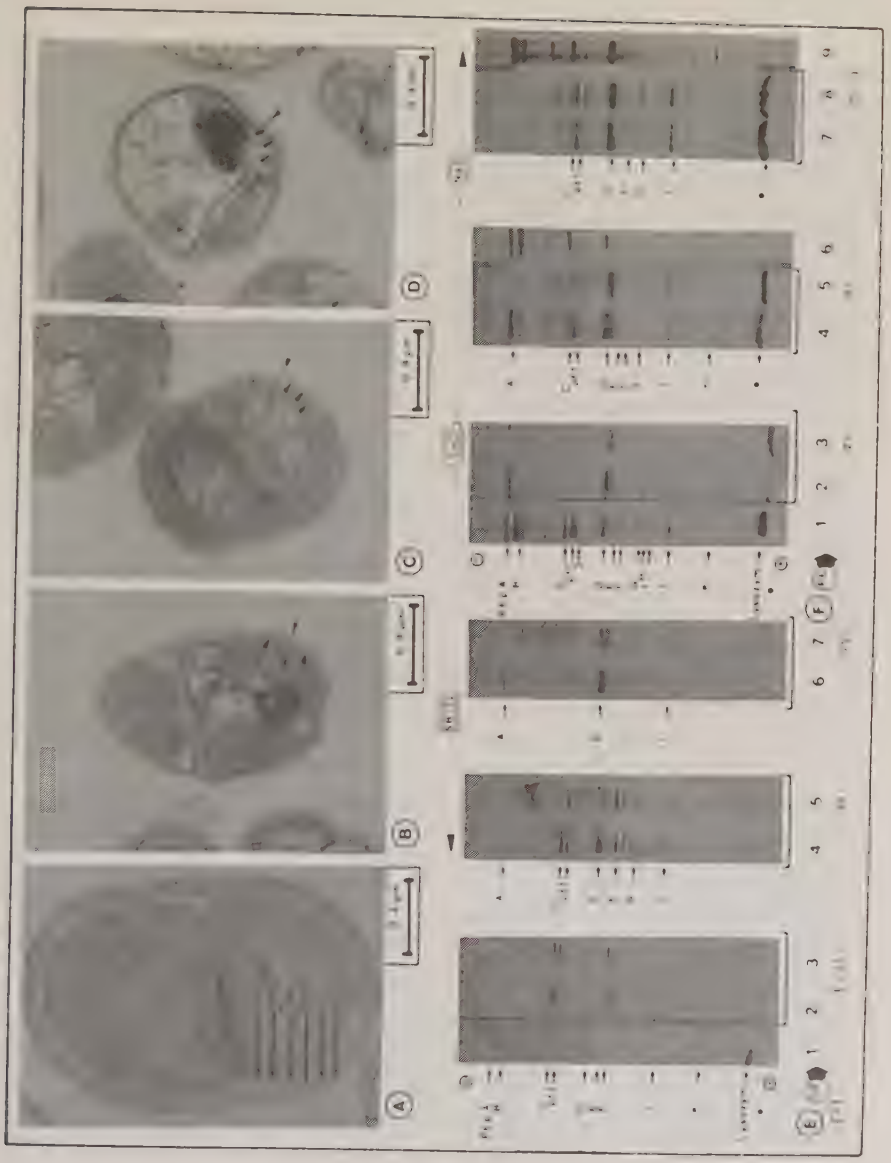
Abb. B,C,D: Ultradünnschnitte von ganzen Bakterienzellen nach Detergensbehandlungen. Die Pfeilköpfe deuten auf morphologische Veränderungen in der Zellwand (siehe 3.2.4.4).
Fixierung: OsO_4/Rutheniumrot
Nachkontrastierung: Uranylacetat/Bleicitrat
Abb. B: Detergens (ohne Begleitionen)
Abb. C: Detergens (+ 15 mM $CuCl_2$)
Abb. D: Detergens (+ 100 mM NaCl)

Abb. E: Elektropherogramme von Detergenssolubilisaten aus Detergensextraktionen an GB:
Bahn 1 (Kontrolle): Elektropherogramm aus PE (+ Lysozym)
Bahn 2-3: Detergens (+ 15 mM $CuCl_2$). Bahn 3: Dissoziationstemperatur 25°C
Bahn 4-5: Detergens (+ 100 mM NaCl). Bahn 5: Dissoziationstemperatur 25°C
Bahn 6-7: Detergens (ohne Begleitionen) Bahn 7: Dissoziationstemperatur 25°C

Abb. F: Elektropherogramme von Detergenssolubilisaten aus Detergensextraktionen an PE (+ Lysozym):
Bahn 1 (Kontrolle): Elektropherogramm aus PE (+ Lysozym)
Bahn 2-3: Detergens (ohne Begleitionen) Bahn 3: Dissoziationstemperatur 25°C
Bahn 4-5: Detergens (+ 100 mM NaCl). Bahn 5: Dissoziationstemperatur 25°C
Bahn 7-8: Detergens (+ 15 mM $CuCl_2$). Bahn 8: Dissoziationstemperatur 25°C
Bahn 6,9: Pellets, gewonnen nach einer dreifachen Detergensextraktion an PE (+ 100 mM NaCl: Bahn 6); PE (+ 15 mM $CuCl_2$: Bahn 9)

Die kleinen Pfeile deuten auf die extrahierten und identifizierten PEp-Polypeptide in der SDS-PAGE.
SDS-PAGE mit Silber gefärbt. Gelgradienten 10 - 16 % Acrylamid. Trenngellänge 14 cm.

Abkürzungen: GB = ganze Bakterien
PE = Pink Envelope



Tafel 42 Histochemischer und elektronenmikroskopischer Nachweis der 5'Nucleotidase (PEp D) und(3'→5')-Exonuclease (PEp A) in der Zellwand von *Deinococcus radiodurans* Sark

Abb. A (Leerwert): Ultradünnschnitte aus ganzen Bakterienzellen. Der 5'-Nucleotidase-Nachweis (siehe 2.10.5.1) wurde ohne DNA bzw. AMP-Zugabe durchgeführt.

Abb. D (Leerwert): Ultradünnschnitte aus Pink Envelope. Der 5'-Nucleotidase-Nachweis (siehe 2.10.5.1) wurde ohne DNA bzw. AMP-Zugabe durchgeführt.

Abb. B,E: Nachweis der 5'-Nucleotidase an der Zelloberfläche von ganzen Bakterienzellen (Abb. B) und von der Pink Envelope (Abb. E), dargestellt mit Ultradünnschnitten (siehe 2.10.5.1 und 3.2.7.2).

Fixierung: Tannin/OsO_4
Nachkontrastierung: Bleihydroxyd

Die Pfeilköpfe deuten auf die Bleiphosphatniederschläge, verursacht durch die frei werdenden Phosphate. Diese werden durch die Om-gebundene 5'-Nucleotidase aus den angebotenen Nucleotiden abgespaltet.

Abb. C,F: Nachweis der(3'→5')-Exonuclease an der Zelloberfläche von ganzen Bakterienzellen (Abb. C) und von der Pink Envelope (Abb. F), dargestellt mit Ultradünnschnitten (siehe 2.10.5.1 und 3.2.7.1).

Fixierung: Tannin/OsO_4
Nachkontrastierung: Bleihydroxyd

Die Pfeilköpfe deuten auf die Bleiphosphatniederschläge (siehe Abb. B und E).

Tafel 43 Topographie der Pink Envelope-Proteine aus *Deinococcus radiodurans* Sark, dargestellt anhand einer bildhaften Veranschaulichung der molekularen Architektur der äußeren Zellwand

Erläuterung der Abkürzungen

CL = Capsular-Layer = Kohlenhydratkapsel
S = S-Layer = HPI-Layer
OM = Outer membran = äußere Membran
IM = Intercalating Material
PG = Peptidoglycan-Layer = Murein

PEp-Hauptproteine: PEp A (= (3'→5')Exonuclease)
PEp B (= HPI-Layer-Monomer)
PEp C
PEp D (= 5'-Nucleotidase)
(gekennzeichnet mit dicken Buchstaben)

PEp-Nebenproteine: PEp G, PEp H, PEp I, PEp J, PEp K,
PEp P(= Proteinase)
(gekennzeichnet mit dünnen Buchstaben)

Weitere Symbole des Schemas

CL: Zuckerpolymere der Lipopolysaccharide sind als weiße rektanguläre Figuren und die Core-Region als weiße birnenförmige Region dargestellt. Heterozuckerpolymeren sind als zum Teil verzweigte weiße und schwarze Ketten dargestellt.

OM: Lipide A-Regionen der Lipopolysaccharide sind als weiße rektanguläre horizontale Figuren in der äußeren Membranhälfte dargestellt. Die weiteren Lipidmoleküle sind mit weißen hydrophilen Köpfen mit zwei hydrophoben Schwänzen dargestellt.

PG: Die beiden Aminozucker des Mureins wurden jeweils als graue und weiße rektanguläre Figuren dargestellt.

CL
S
OM
IM
PG

Tafel 44 Topographie der Omp-Proteine aus *Escherichia coli*, wiedergegeben anhand einer bildhaften Darstellung der molekularen Architektur der Zellwand

(entnommen aus Lugtenberg und Van Alphen, 1983)

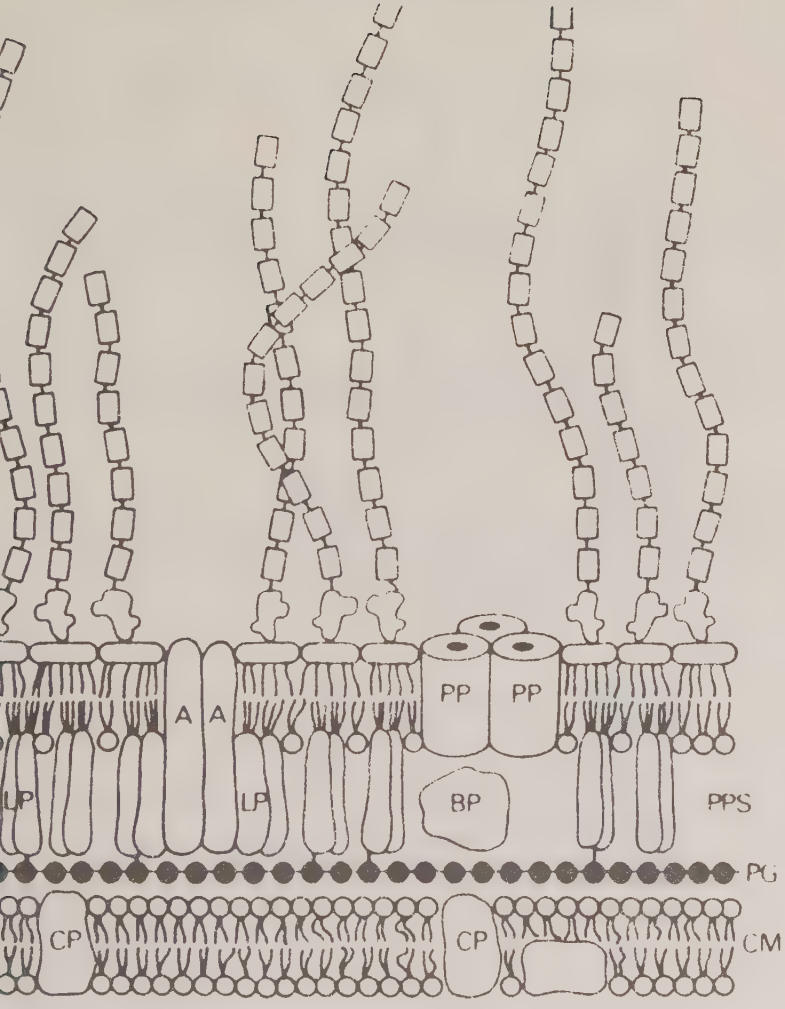
Erläuterungen der Abkürzungen

PPS = periplasmic space = periplasmatischer Raum*
PG = peptidoglycan layer = Murein
CM = cytoplasmic membrane = cytoplasmatische Membran

PP = pore proteins = Poren-Proteine
A = Omp A Protein
LP = Lipoprotein
BP = nutrient binding protein = Metabolit bindendes Protein
CP = carrier protein = Transport-Protein

Für weitere Erläuterungen über die Symbole des Schemas siehe Tafel 43

(*) NB: Es handelt sich hier vielmehr um die Mittelschicht und nicht um den periplasmatischen Raum. Laut Definition (siehe Kap. 4.4) befindet sich der periplasmatische Raum zwischen der cytoplasmatischen Membran (Cm) und dem Murein (PG).


A
A
PP
PP
LP
LP
BP
PPS
PG
CP
CP
CM

Tafel 45 Bildhafte Veranschaulichung der sich ergänzenden Abbaufunktionen der (3'→5')-Exonuclease (PEp A) und der 5'-Nucleotidase (PEp D) in der äußeren Membran von *Deinococcus radiodurans*

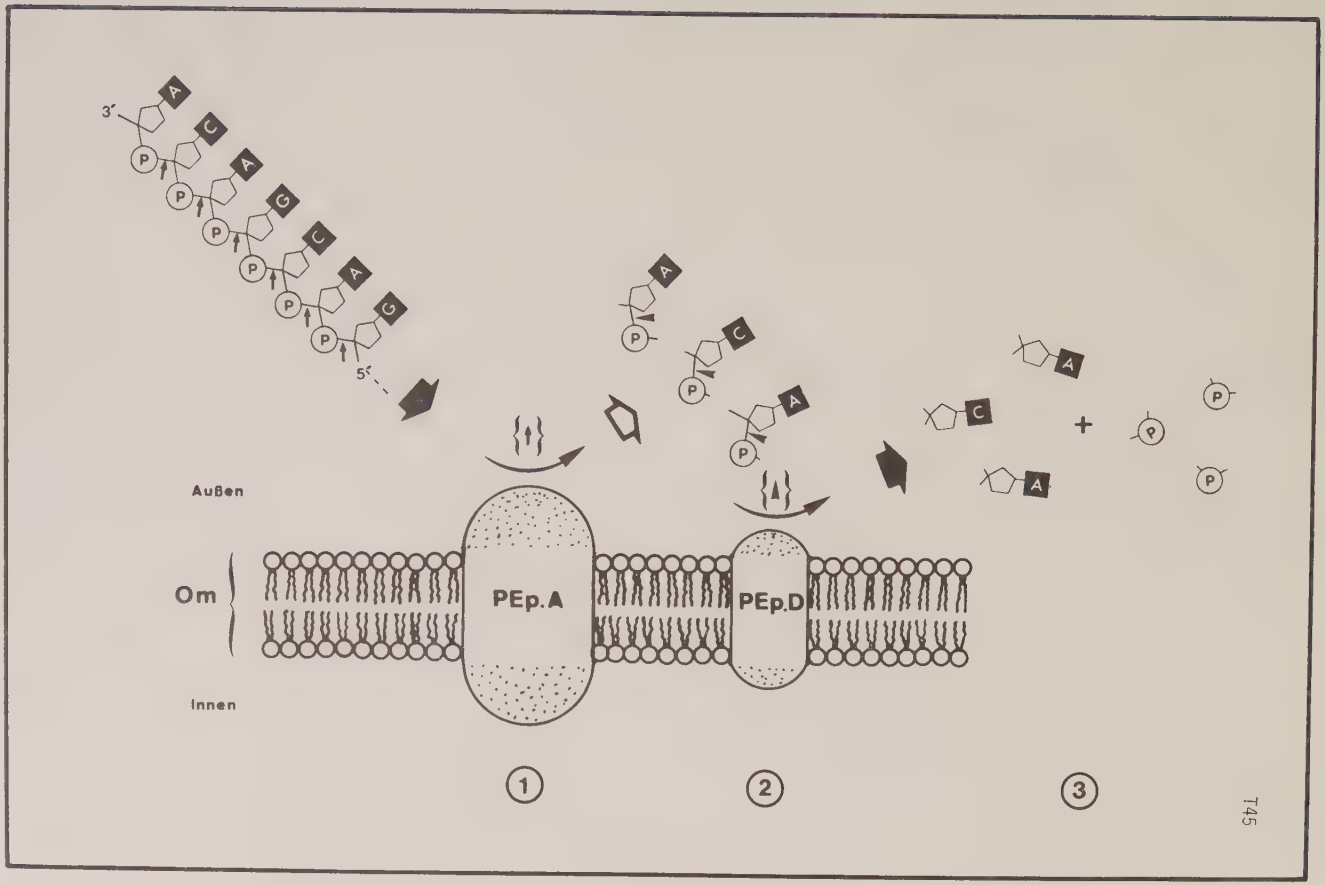
Beide Enzyme sind als Transmembranproteine dargestellt (siehe Tafel 43 und 4.2).

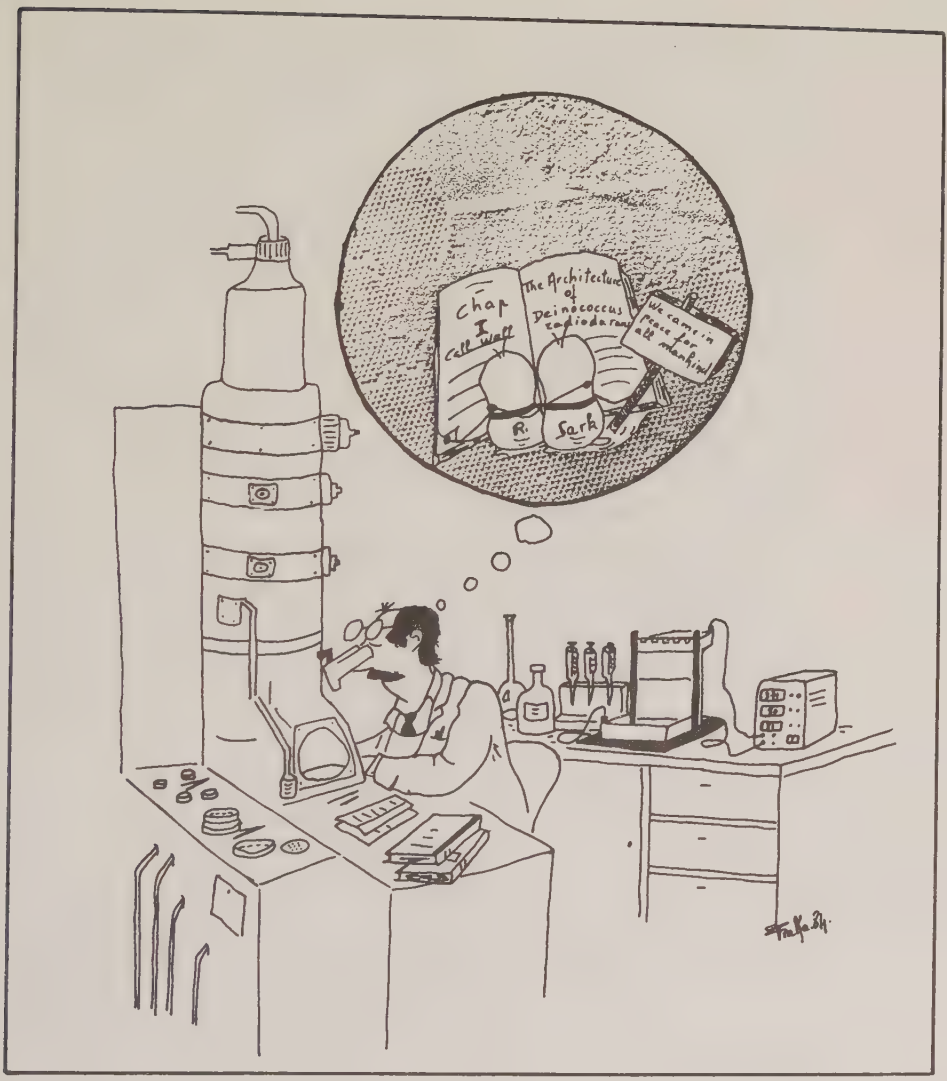
Schritt 1: Die (3'→5')-Exonuclease baut hier ein einsträngiges DNA-Molekül in 3'-Stellung ab. Das Enzym arbeitet von 3'- nach 5'-Stellung. Die Reaktionsprodukte sind Nucleoside, die in 5'-Stellung phosphoryliert sind. Das aktive Zentrum des Enzyms ist für Substrate von außen zugängig (siehe 3.2.7).

Schritt 2: Die 5'-Nucleotidase ist in einer engen räumlichen Beziehung mit der (3'→5')-Exonuclease. Sie entphosphoryliert die Reaktionsprodukte der (3'→5')-Exonuclease (die Nucleotide). Die Reaktionsprodukte sind Nucleoside und Phosphate (siehe 3.2.3.1.2 und 3.2.7).

Schritt 3: Die Reaktionsprodukte dieser sukzessiven enzymatischen Abbaureaktionen sind Nucleoside und Phosphate. Die weitere Vorstellung ist, daß diese Metabolite durch passive Diffusion mit Hilfe von hydrophilen Membrankanälen (Poren-Proteine) zum Zellinneren transportiert werden können.

P = Phosphat; A = Adenin; C = Cytosin; G = Guanin.
Die weißen fünfeckigen Moleküle symbolisieren Zuckermoleküle (Deoxyribose).
Die kleinen Pfeile deuten auf die spezifischen Spaltungsstellen der (3'→5')-Exonuclease.
Die Pfeilköpfe deuten auf die spezifischen Spaltungsstellen der 5'-Nucleotidase.
Alle übrigen Pfeile deuten auf eine mögliche vektorielle Richtung der Reaktionsabläufe bzw. Katalysen zwischen den beiden Enzymen.


3'
5'
A
C
A
G
C
A
G
P
Außen
Om
Innen
PEp.A
PEp.D
1
2
3
T45


Chap I
Cell Wall
The Architecture of Deinococcus radiodurans
We come in peace for all mankind
R.
Sark

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie der Universität Düsseldorf und wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Projekt Ba 618/6-1) mit finanziellen Mitteln unterstützt.

Herrn Prof. Dr. W. Baumeister, meinem Referenten, danke ich ganz besonders, sowohl für seine wertvollen Anregungen, Diskussionen und seine großzügige Unterstützung als auch für sein Engagement und sein Interesse an dem Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. C. Hollenberg, meinem Korreferenten, danke ich für seine Bereitwilligkeit zur Übernahme des Korreferats und für sein Interesse.

Herrn Prof. Dr. W. Vogell danke ich besonders für die großzügige mir gewährte Freiheit, Arbeitsmöglichkeit und Unterstützung im Institut während der Durchführung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biophysik und Elektronenmikroskopie danke ich für die mir gewährte Hilfe, insbesondere Frau Türken und Frau Wenzel für die ausgezeichneten Fotoarbeiten, ebenso Herrn Schneider für die wertvolle technsiche Hilfe bei der Weiterentwicklung der Elektrophorese-Apparaturen wie Frau Werner für ihre Geduld und ihr Engagement bei der Herstellung der Reinschrift.

Einigen Kollegen und Freunden der Abteilung für molekulare Strukturbiologie (Leitung: Prof. Dr. W. Baumeister) am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, möchte ich herzlich danken, vor allem

Dr. Harald Engelhardt, Dr. Reinhard Guckenberger und Dr. Jürgen Peters für ihre beispielhafte Hilfsbereitschaft sowie für eine fruchtbare Zusammenarbeit und für ihre vielen interessanten und konstruktiven Diskussionen.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Priv. Doz. Dr. Gerd Steffens (Leiter der Abteilung für Proteinchemie bei Grünenthal GmbH, Aachen) und seinen Mitarbeiterinnen Frau Grotenrath und Frau Mertens für die bereitwillige Durchführung von zahlreichen Aminosäurenanalysen bedanken.

Mein Dank gilt auch meinem Freund Dr. Ivo Wildhaber im Institut für Zellbiologie an der ETH-Zürich für die fruchtbare Zusammenarbeit und die Metallbedampfungen von gefriergetrockneten Präparaten.

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund Dipl. Biol. Bernd Kleffel für seine Einführung in die Meßtechnik der Infrarot-Spektroskopie.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meiner langjährigen Kollegin Dipl. Biol. Barbara Emde-Kamola für die fruchtbare und angenehme Zusammenarbeit in unserem Labor bedanken.

Schließlich und nicht zuletzt danke ich herzlich meiner Frau Karin; sie hat mit ihrem Verständnis, ihrer Geduld und Unterstützung sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Für ihre hervorragende künstlerische Arbeit bei der Umsetzung und Anfertigung der Zeichnung zur molekularen Architektur der Zellwand möchte ich mich nochmals bedanken. Ein Dank gilt in diesem Zusammenhang auch unserem Freund Rüdiger Hempel für seine wertvolle technische Angabe zur perspektivischen Darstellung.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name:	Franck Hugues Tony Marie KARRENBERG
Geburtsdatum:	1. Februar 1954
Geburtsort:	Saint Maur des Fossés (Val de Marne) (Frankreich)
Eltern:	Ulrich KARRENBERG
	Suzanne KARRENBERG geborene BADIER
Familienstand:	verheiratet mit Karin KARRENBERG geb. BENNEMANN

Bildungsweg:

1958 - 1965	Besuch der Volksschule "Ecole primaire" in Villefranche d'Allier (Frankreich)
1965 - 1970	Besuch des Gymnasiums "Lycée d'Etat de Garçons-Jule Ferry" in Montluçon (Allier) (Frankreich)
1969	"Brevet élémentaire du premier cycle"
1970 - 1972	Besuch des Gymnasiums "Lycée classique et moderne d'Etat mixte" in Montluçon (Allier) (Frankreich)
1972	"Baccalaureat. Section D (Mathematiques et Sciences de la Nature)"
1972 - 1974	Studium "Etudes à l'U.E.R. de Pharmacie de l'Université de Clermont-Ferrand (Puy de Dome) (Frankreich)
1974 - 1975	Einreise in die Bundesrepublik Deutschland; beschäftigt als Hilfspfleger im Städtischen Krankenhaus Velbert
1975 - 1981	Biologiestudium an der Universität Düsseldorf
1978	Diplom-Vorprüfung in der Biologie
1980	Diplom-Hauptprüfung in der Biologie
1980 - 1981	Diplomarbeit am Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie der Universität Düsseldorf. Betreuer: Priv. Doz. Dr. W. Baumeister
1981	Biologie-Diplom
seit Sept.1981	Dissertation am Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie der Universität Düsseldorf. Betreuer: Prof. Dr. W. Baumeister (Max-Planck-Institut für Biochemie. Leiter der Abteilung für molekulare Strukturbiologie, Martinsried bei München
seit 1983	wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie der Universität Düsseldorf

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606